

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Programa de pós-graduação em física

Willyan Cardoso Santos Da Silva

**APLICAÇÕES DE ESPALHAMENTO RAMAN
ESTIMULADO EM BIOMEDICINA**

Belo Horizonte

2024

Willyan Cardoso Santos Da Silva

APLICAÇÕES DE ESPALHAMENTO RAMAN ESTIMULADO EM BIOMEDICINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Leandro Malard Moreira

Belo Horizonte

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586a Silva, Willyan Cardoso Santos da.
Aplicações de espalhamento Raman estimulado em biomedicina / Willyan
Cardoso Santos da Silva. – 2024.
70 f. : il.

Orientador: Leandro Malard Moreira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.
Bibliografia: f. 59-68.

1. Raman, Espalhamento. 2. Nervo ótico. I. Título. II. Moreira, Leandro
Malard. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

CDU – 535.33 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ATA

ATA DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO DA 732ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, DEFENDIDA POR WILLYAN CARDOSO SANTOS DA SILVA orientado pelo professor Leandro Malard Moreira, para obtenção do grau de **Mestre, área de concentração Física**. Às 09:00 horas de vinte e sete de setembro de dois mil e vinte e quatro reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores **Leandro Malard Moreira** (Orientador - Departamento de Física/UFMG), **Ana Maria de Paula** (Departamento de Física/UFMG) e **Rafael Pinto Vieira** (Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG), para dar cumprimento ao Artigo 37 do Regimento Geral da UFMG, submetendo o licenciado **WILLYAN CARDOSO SANTOS DA SILVA** à arguição de seu trabalho de dissertação, que recebeu o título de "**Aplicações de espalhamento Raman estimulado em biomedicina.**" O candidato fez uma exposição oral de seu trabalho durante aproximadamente 50 minutos. Após esta, os membros da comissão prosseguiram com a sua arguição, e apresentaram seus pareceres individuais sobre o trabalho, concluindo pela aprovação do candidato.

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2024.

Prof. Leandro Malard Moreira
Orientador do estudante
Departamento de Física/UFMG

Profa. Ana Maria de Paula
Departamento de Física/UFMG

Prof. Rafael Pinto Vieira
Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG

Candidato: Willyan Cardoso Santos da Silva



Documento assinado eletronicamente por **Willyan Cardoso Santos da Silva, Usuário Externo**, em 02/10/2024, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 02/10/2024, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Pinto Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 02/10/2024, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Malard Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 02/10/2024, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3604437** e o código CRC **A0C18367**.

Referência: Processo nº 23072.255498/2024-83

SEI nº 3604437

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha mãe, Maria Aparecida, e ao meu pai, Salvador, por me proporcionarem a oportunidade de me dedicar aos estudos e por sempre me incentivarem a fazer isso. Agradeço também aos meus irmãos, Mara e Wevelly, por seu apoio, e aos meus sobrinhos Kauã e Ian, por me motivarem a sempre ser melhor e tentar inspirá-los também.

Gostaria de agradecer à minha companheira, Luane, por estar sempre ao meu lado me motivando, apoiando e me ajudando a seguir em frente além de me dar o melhor presente do mundo, a nossa filha Elizabeth.

Agradeço aos amigos que fiz durante o mestrado, mas em especial aos que vieram comigo nessa jornada (Joás, Júlia e Mateus), por todas as conversas e risadas ao longo desses anos.

Agradeço ao pessoal do LabNS, Lucas Valente, Diego, Douglas, Gustavo, Jane, Matheus, Rafael Nadas, Márcia, Tiago, Maria Alice, Sofia, Carol, Rafael Rojas, Gabriella, Vitor Monken, Vitor Augusto, André, Catarina, por estarem sempre dispostos a ajudar e por proporcionarem um ambiente de trabalho de excelente convivência.

Ao grupo do Xubaka, Danilo, Fred, Felipe e Augusto que me ajudaram a entender como utilizar os equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho e em especial ao Renan, Emerson e o Prof. Rafael Vieira pela paciência e por todas as colaborações que eles me possibilitaram.

Agradeço também aos meus professores por me transmitirem, da melhor forma possível, o conhecimento necessário para superar esta etapa. Um agradecimento especial ao meu orientador, Leandro (Xubaka), pela paciência, disposição, compreensão e apoio durante todo esse período.

Por fim, não posso deixar de agradecer aos órgãos de fomento que ajudaram a transformar meu sonho em realidade. Obrigado CAPES, FAPEMIG, CNPq, e também à UFMG e ao Departamento de Física.

“I have loved the stars too truly to be fearful of the night.”

Sarah Williams

Resumo

Nesta dissertação, são detalhadas as técnicas de Espectroscopia Coerente Anti-Stokes Raman (CARS) e de Espectroscopia Raman Estimulada (SRS), que se destacam como métodos ópticos avançados para investigar materiais biológicos com alta resolução e sensibilidade. Essas técnicas permitem a obtenção de informações detalhadas sobre a composição e estrutura de amostras biológicas, possibilitando análises não invasivas e em tempo real. Além de revisar as aplicações das técnicas CARS e SRS descritas na literatura, este estudo emprega CARS e SRS para caracterizar e analisar diferentes materiais biológicos. Foram investigadas leishmânias, nervos ópticos de camundongos em diferentes condições de degeneração, incluindo degeneração Walleriana (WD) e modelo da doença de Huntington (HD), e nervos trigêmeos de camundongos, onde foi possível diferenciar entre dois modelos distintos. Em todos os casos, as técnicas de SRS e CARS demonstraram-se eficazes na caracterização e análise dos materiais biológicos estudados.

Palavras-chave: CARS, SRS, Nervos Ópticos, Nervos trigêmeos, Leishmânias

Abstract

In this dissertation, the techniques of Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS) are detailed, highlighting their roles as advanced optical methods for investigating biological materials with high resolution and sensitivity. These techniques allow for the acquisition of detailed information about the composition and structure of biological samples, enabling non-invasive and real-time analysis. In addition to reviewing the applications of CARS and SRS techniques in the literature, this study utilizes CARS and SRS to characterize and analyze different biological materials. The study focuses on leishmania, optic nerves of mice under different degeneration conditions, including Wallerian degeneration (WD) and the Huntington's disease (HD) model, and trigeminal nerves of mice, where it was possible to differentiate between two distinct models. In all cases, the SRS and CARS techniques proved effective in the characterization and analysis of the studied biological materials.

Keywords: CARS, SRS, Optic Nerves, Trigeminal nerves, Leishmania

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração do processo de FWM e diagrama de conservação de energia,(a) para o caso onde $\omega_4 = \omega_1 + \omega_2 + \omega_3$ (b) para o caso onde $\omega_4 = \omega_1 + \omega_3 - \omega_2$	23
Figura 2 – A) Ilustração do espalhamento Rayleigh e Raman, onde vemos um feixe incidente ω_p , incidindo sobre uma molécula vibrando e espalhando um feixe ω_p (espalhamento elástico Rayleigh), um feixe ω_s (espalhamento Raman Stokes) e um ω_{aS} (espalhamento Raman anti-Stokes) espalhados inelasticamente pela vibração molecular. B) Diagrama de energia do espalhamento Rayleigh e dos espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes. C) Ilustração de um espectro de um laser incidente (Pump) em uma molécula vibrando, demonstrando como seriam os picos relacionados ao espalhamento Stokes e anti-Stokes	24
Figura 3 – Diagrama do processo do CARS	25
Figura 4 – Gráficos mostrando a relação da amplitude do sinal em relação à variação de Δ , (a) de cada termo da intensidade separadamente; (b) da intensidade total do CARS em relação ao background não ressonante $ \chi_{nr}^{(3)} ^2$	27
Figura 5 – Diagrama de energia dos processos SRS.(A) Diagrama de energia do SRG, onde temos três campos $(\omega_p, \omega_s, -\omega_p)$ gerando uma quarta onda (ω_s) . (B) Diagrama de energia do SRL, onde temos três campos $(\omega_p, \omega_s, -\omega_s)$ gerando uma quarta onda (ω_p) . Ambos efeitos no SRS são mediados por um modo vibracional de frequência (ω_ν)	29
Figura 6 – Comparação entre a microscopia Raman estimulada de banda estreita e a microscopia Raman espontânea em diferentes geometrias de dispersão. Três placas diferentes de $(A\beta)$ foram imageadas por SRS (A, C, E) e SpRS hiperespectral (B, D, F), obtidas em diferentes energias vibracionais, conforme listado na parte inferior das imagens. Todas as barras de escala são de 20 μm . Imagens sem uma barra de escala compartilham a barra de escala da imagem mais à esquerda na mesma linha	33
Figura 7 – Representação esquemática do longo e tedioso processo de histopatologia. Os pacientes precisam passar por uma varredura inicial para identificar o tumor. Em seguida, é realizada uma seção da amostra, que passa por várias etapas de processamento que demoram mais tempo e precisam ser confirmadas por um neuropatologista, o que aumenta as chances de erro. Um erro ou a remoção parcial do tumor leva a cirurgias invasivas, afetando novamente a saúde e a qualidade de vida do paciente.	35

Figura 8 – Representação esquemática do processo de espectroscopia Raman. temos em (a) A sonda de laser Raman é usada sobre a amostra , (b) Os espectros Raman que são fornecidos pelo estudos de Kelly <i>et al</i> , (c) Este processamento, usando o modelo computacional, distingue entre espécimes tumorais e normais, (d) O sistema completo contendo todos esses componentes é o conjunto de espectroscopia Raman.	36
Figura 9 – Imagens SRS sem marcação de DNA (magenta), proteínas (azul) e lipídios (verde) em células vivas. Foram adquiridas imagens SRS em três deslocamentos Raman selecionados na banda vibracional de alongamento CH. A decomposição linear foi realizada com uma matriz de calibração previamente medida para recuperar a distribuição de DNA, proteínas e lipídios.	38
Figura 10 – (A) A montagem experimental utilizada para CARS e SRS, (B) uma ilustração da imagem formada.	40
Figura 11 – Esquema de movimentação do estagio.	44
Figura 12 – Imagem de CARS do nervo óptico em corte transversal com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , em A) primeira imagem B) segunda imagem C) terceira imagem com barra de escala de $50\mu\text{m}$	45
Figura 13 – <i>Stitch</i> de imagem CARS do nervo óptico em corte longitudinal com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com A, B, C, D, E e F são respectivamente a sequencia de imagens do <i>stitch</i> com barra de escala de $50\mu\text{m}$	46
Figura 14 – Montagem de 45 imagens de Leishmânia com frequência vibracional excitada em 2932cm^{-1} , com uma barra de escala de $100\mu\text{m}$	46
Figura 15 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo controle com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$	48
Figura 16 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo operado sete dias com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$	48
Figura 17 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo operado 14 dias com frequência vibracional excitada em 2845cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$	49
Figura 18 – Imagem do nervo óptico em corte transversal com frequência vibracional excitada em 2845cm^{-1} comparando CARS e TPEF, em A,B e C a montagem que forma a imagem CARS e em E,F e G a montagem que formam a imagem em TPEF. Com barra de escala de $50\mu\text{m}$	50

Figura 19 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo controle com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$	52
Figura 20 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo Huntigton com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$	52
Figura 21 – Imagem CARS do corte de nervo trigêmeo modelo operado com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$	54
Figura 22 – Imagem CARS do corte de nervo trigêmeo modelo NaV com frequência vibracional excitada em 2845cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$	54
Figura 23 – Imagem SRS do leishmania infantum com frequência vibracional excitada em 2932cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$. Em A a imagem feita em SRS, em B o zoom em uma das leishmanias para destacar o formato.	55
Figura 24 – Imagem SRS do C com frequência vibracional excitada em 2932cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$. Em A a imagem feita em SRS, em B o zoom em uma das leishmanias para destacar o formato.	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Neurodegeneração	16
1.1.1	Degeneração axonal	16
1.1.2	Doença de Huntington (HD)	17
1.2	Nervo trigêmeo	18
1.3	Leishmânias	19
1.4	Estrutura do trabalho	20
2	EFEITO RAMAN ESTIMULADO	21
2.1	Óptica não-linear	21
2.1.1	Four-Wave mixing (FWM)	22
2.2	Coherent Raman scattering	23
2.2.1	Coherent Raman anti-stokes scattering	25
2.2.2	Stimulated Raman scattering	28
3	APLICAÇÕES	32
3.1	Aplicações em placas β-amilóide	32
3.2	Aplicação em câncer	34
3.3	Aplicação em DNA	38
4	METODOLOGIA	40
4.1	Montagem experimental	40
4.2	Preparação	41
4.2.1	Amostras	41
4.2.2	Sistema	42
4.2.3	Análise de dados	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1	Implementação de imageamento por SRS em grandes áreas	43
5.1.1	Automatização	43
5.1.2	Testes	44
5.2	Aplicações e Resultados	46
5.2.1	Degeneração Walleriana	47
5.3	Doença de Huntigton	51
5.4	O nervo trigêmeo	53
5.5	Leishmania	55

6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	57
6.1	Conclusões	57
6.2	Perspectivas futuras	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICES	69
	APENDICE A - Código Python para Automação do Estágio	70

1 Introdução

O efeito Raman é o espalhamento inelástico da luz e foi observado experimentalmente por Chandrasekhara Venkata Raman em 1928 [1]. Nesse experimento foi observado que quando a luz incide em uma amostra, parte dela é espalhada de forma elástica (Rayleigh) e parte é espalhada de forma inelástica (Raman), o que lhe rendeu o prêmio nobel de física em 1930. Dessa descoberta surgiu uma técnica que utiliza a dispersão inelástica da luz para fornecer informações sobre modos vibracionais de moléculas escolhidas que recebeu o nome de espectroscopia Raman. As mudanças na energia desses fótons inelásticos são relacionadas aos modos vibracionais das moléculas ou sólidos, proporcionando informações sobre a estrutura molecular [2].

Com o aperfeiçoamento da espectroscopia Raman surgiram diversas variações dessa técnica, entre elas existe o espalhamento Raman estimulado (SRS) do inglês *Stimulated Raman Scattering* e o Espalhamento Raman Coerente Anti-Stokes (CARS) do inglês *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*. Existem algumas diferenças entre essas técnicas que serão abordadas no capítulo 2 e devido à essas diferenças em algumas aplicações o SRS possui vantagem [3]. A descrição teórica sobre essas técnicas será desenvolvida no capítulo 2 em suas respectivas seções.

As técnicas de CARS e SRS são amplamente utilizadas em materiais biológicos, pois entre os pontos positivos temos o baixo tempo de aquisição de imagem que evita a degradação da amostra [4]. E em comparação com a fluorescência essas apresentam resultados promissores em *label-free* do inglês sem marcadores que são técnicas que não dependem de marcadores químicos para análise de caracterização dos materiais biológicos [5]. Devido a essas vantagens, este trabalho tem como objetivo a utilização do CARS e do SRS para o imageamento e a caracterização e análise de materiais biológicos tendo três em destaque, as leishmânias, nervos ópticos com dois tipos de degeneração, a primeira delas ocorrendo em camundongos transgênicos no modelo de doença de Huntington, a segunda foi causada através de uma operação afim de causar a degeneração axonal. O terceiro material trabalhado nesta dissertação foram os nervos trigêmeos de camundongos.

A seguir, vamos explorar com mais detalhes cada um desses temas mencionados e a importância de desenvolver técnicas de imageamento.

1.1 Neurodegeneração

As doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington são exemplos de doenças neurodegenerativas que afetam o sistema nervoso [6]. Elas surgem devido à progressiva degeneração e perda de células nervosas no cérebro e em alguns casos, em outras regiões do sistema nervoso [7]. Essas doenças podem ser classificadas como neurodegenerações primárias, que são aquelas em que as funções cerebrais se degradam de forma gradual, lenta e acabam por serem irreversíveis [8].

Nessa dissertação vamos trabalhar com análise da degeneração axonal (Walleriana) seção 1.1.1 e a neurodegeneração na doença de Huntington seção 1.1.2.

1.1.1 Degeneração axonal

Um tipo de neurodegeneração que causa perda de funcionalidade motora é a degeneração axonal [9]. Doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington podem causar essa degeneração [10].

Os primeiros estudos da degeneração axonal são apresentados no século XIX, com a descrição de Augustus Volney Waller do processo que hoje conhecemos como “degeneração Walleriana” (WD) do inglês *Wallerian degeneration*. Ele descreveu que após a secção de um nervo, o axônio distal degenera e a parte proximal pode se regenerar [11]. Esse estudo foi essencial para entender os processos de degeneração neuronal [12, 13].

A WD é um processo que ocorre quando há lesão no nervo periférico, isso resulta em uma degeneração do axônio distal ao local da lesão [14]. Esse processo pode apresentar diversas consequências como desafios na recuperação funcional, instabilidade motora e sensorial, atrofia tecidual e perda da densidade de fibras nervosas [15].

Hoje já existem técnicas capazes de diagnosticar a WD como eletrofisiologia, imagem por ressonância magnética e tomografia. [16, 17]. Porém essas técnicas apresentam diversos problemas que vão desde ser desconfortáveis ao paciente, o altíssimo custo para utilização, a falta de capacidade de detecção de pequenas lesões, além disso a maioria dessas técnicas são invasivas, seja pela utilização de eletrodos inseridos diretamente em tecidos internos, o que pode causar desconforto e riscos de infecção, por envolver a administração de agentes de contraste ou até mesmo por exposição à radiação ionizante e ao uso de contrastes, que podem ser administrados por via intravenosa ou oral.

Dada a importância da identificação da WD e de como é essencial o entendimento dela na neurociência para proporcionar um diagnóstico preciso, juntamente com os problemas citados nas formas de diagnóstico atuais, O CARS se apresenta como um método menos invasivo para realizar essa detecção principalmente por não utilizar radiação

ionizante, não exigir contrastes, e por seu impacto mínimo na amostra ou no paciente. Assim neste trabalho, utilizamos o CARS com o objetivo de diferenciar entre modelos controle (animais sem neurodegeneração) e modelos com sete e 14 dias após uma cirurgia induzindo neurodegeneração.

1.1.2 Doença de Huntington (HD)

A doença de Huntington (HD) do inglês *Huntington disease* é uma doença neurodegenerativa que causa uma mutação no gene HTT é um gene que fornece instruções para a produção da proteína huntingtina. Esse gene está localizado no cromossomo quatro e é crucial para o funcionamento normal das células nervosas [18]. Essa proteína causa a morte das células nervosas, principalmente as responsáveis pela movimentação e cognição [19].

Os primeiros registros da doença de Huntington datam do século XIX e foi feita por George Huntington no seu artigo de 1872 chamado "*on chorea*" [20]. Ele descreveu três características principais:

- Os movimentos rápidos e irregulares que afetam a face, as mãos e os pés.
- O declínio cognitivo que inclui problemas de memória dificuldades de pensamento e mudança de personalidade.
- E o fator genético onde foi observado que há uma chance de 50% de chances de que a doença seja herdada pelos filhos caso um dos pais tenha a doença.

Mas, foi somente através das pesquisas realizadas em 1993 que foi identificado que o gene causador da doença se localiza no cromossomo quatro, esse é um gene específico o HTT [21, 22].

Em geral essa doença começa se manifestar na idade adulta, entre 30 e 50 anos, e tende a piorar ao longo do tempo, levando a uma deterioração cognitiva progressiva das funções motoras e mentais [23, 24]. Apesar de atualmente ainda não existir uma cura para a HD, existem tratamentos para retardar e controlar os sintomas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes [25].

No estudo de Valerie Crowell de 2020 [26] Estima-se 66.787 indivíduos diagnosticados com HD em 8 países sendo eles Brasil, Canadá, França, Alemanha, Itália, Espanha, Reino Unido e EUA, com prevalência diagnosticada variando de 3,5 a 9,0 por 100.000 pessoas, com o Brasil apresentando uma prevalência de 3,5.

Os métodos atuais de diagnóstico da HD são muito complexos, como o mapeamento genético e utilização de marcadores bioquímicos como o níveis de Proteína Huntingtina

para imageamento, esses métodos possuem limitações como os recursos necessários e a dificuldade de diferenciar pacientes sintomáticos e assintomáticos [27].

Dessa forma o CARS se apresenta como um opção para imageamento e identificação da neurodegeneração causada pela HD, para isso nesta dissertação foram utilizados nervos ópticos de camundongos no modelo da HD onde foram feitas comparações com modelos controles (sem a doença), afim de verificar a diferença entre o nervo degenerado e o nervo saudável.

1.2 Nervo trigêmeo

O nervo trigêmeo TN do inglês *trigeminal nerve* é classificado como um nervo misto, contendo fibras tanto sensitivas quanto motoras [28]. As fibras sensitivas desempenham um papel crucial no quadro nevrálgico, sendo responsáveis pela sensibilidade proprioceptiva, que abrange a pressão profunda e a cinestesia que é a sensação de movimento e posição dos músculos e articulações e permitindo a percepção da postura e movimentos faciais, além de proporcionar sensações exteroceptivas que são as percepções de estímulos do ambiente externo, como tato, dor e temperatura, mediadas por receptores na pele e mucosas como tato, dor e temperatura na face e em parte do crânio [29]. Além disso, o TN inerva os músculos envolvidos na mastigação. As fibras sensitivas relacionadas ao estiramento e à propriocepção convergem para o gânglio de Gasser [30]. Essas fibras alcançam o gânglio por meio das três ramificações do nervo (maxilar, mandibular e oftálmico), cada uma delas apresentando áreas específicas de inervação em ambos os lados da face [31].

Os estudos sobre o TN vem desde a antiguidade até os tempos modernos e evoluíram com o avanço dos séculos [32]. Os avanços da tecnologia dos séculos XX e XXI possibilitaram um entendimento aprofundado da anatomia e das funções deste nervo [33].

As formas de diagnósticos de problemas relacionados ao TN hoje em dia se consistem em ressonância magnética, tomografia computadorizada e angiografia variando sua escolha de acordo com os sintomas do paciente [34, 35].

Apesar dos avanços de hoje essas técnicas ainda apresentam certas dificuldades e limitações assim como citado na sessão anterior como a dificuldade de resolução para identificação de pequenas lesões e seus custos de aplicação sendo necessário a combinação de algumas delas para um diagnóstico preciso.

Devido esses problemas apresentamos o CARS como uma alternativa menos invasiva por não utilizar radiação ionizante, não exigir contrastes, e por seu impacto mínimo na amostra ou no paciente como dito na 1.1.2 e assim mais aplicável no diagnóstico de problemas relacionados ao TN. Para isso nesse trabalho utilizamos o CARS para diferenciar dois modelos o primeiro sendo um modelo canais de sódio dependentes de voltage (NaV)

do inglês *Voltage-gated Sodium Channels*, o modelo natural do nervo e um segundo modelo, o operado onde foi feita uma cirurgia para criar uma lesão no nervo para ser identificada pelo CARS.

1.3 Leishmânias

A leishmaniose atinge mais 12 milhões de pessoas no mundo todo, distribuídas em cerca de 88 países, entre eles o Brasil, existem casos onde a subnotificação pode chegar a ser até 5 vezes maior do que o relatado [36]. A leishmaniose se dividem em diversas formas, entre elas temos a leishmaniose cutânea (LC), que é a forma mais comum de leishmaniose ela provoca úlceras cutâneas e lesões na pele [37], outro tipo é a leishmaniose visceral essa é a forma mais grave da doença, tendo como principais sintomas febre alta e persistente, perda de peso, podendo até mesmo afetar os órgãos internos, principalmente o fígado e o baço, sendo capaz de levar até mesmo ao óbito se não tratada [38].

Então com a existência das diversas formas dessa doença se torna necessário entender como são provocadas cada uma delas. Esse conhecimento pode viabilizar a utilização do tratamento correto para cada uma das formas. A leishmaniose é causada por um protozoário da família Trypanosomatidae chamado de leishmânia [39], esse possui diversas espécies diferentes, neste trabalho iremos analisar três dessas espécies, as Amazonensi que é responsáveis pela forma cutâneas e a Infantum que é responsável pela forma visceral.

Como citado o entendimento de qual forma da leishmaniose está sendo tratada é de suma importância para o tratamento, sendo assim buscamos com essa pesquisa utilizar o SRS para caracterizar morfológicamente as três espécies citadas. O SRS se apresenta como uma alternativa excelente para esse processo pois as formas de caracterização como a caracterização eletroforética das isoenzimas e outras técnicas laboratoriais apresentam certos problemas como o tempo para aquisição de dados sendo de dias até semanas. [40]

1.4 Estrutura do trabalho

Este trabalho está organizado da seguinte maneira:

Capítulo 2: Neste capítulo, será apresentada uma introdução à óptica não linear, um campo que explora os comportamentos da luz quando interage com materiais em condições que vão além da óptica linear convencional. Dentro desse contexto, abordaremos tanto a teoria fundamental quanto a descrição detalhada das técnicas de CARS e SRS. Essas técnicas são amplamente utilizadas em diversos campos da ciência, especialmente em bioimagem e análise de materiais, devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura molecular. Ao longo deste capítulo, forneceremos uma visão geral dessas técnicas, preparando para uma compreensão mais aprofundada nos capítulos subsequentes.

Capítulo 3: O terceiro capítulo é dedicado a uma revisão da literatura, focando nas diversas aplicações das técnicas de Raman estimulado em materiais biológicos. Especificamente, exploramos como essas técnicas têm sido empregadas em estudos relacionados às retinas de camundongos, particularmente no contexto de modelos experimentais da doença de Alzheimer. Além disso, discutimos as aplicações dessas técnicas no diagnóstico de câncer. Outra área de destaque neste capítulo é o uso de Raman estimulado para investigações de DNA.

Capítulos 4: O quarto capítulo é dedicado à metodologia empregada ao longo da pesquisa. Nele, detalhamos a montagem experimental, incluindo os componentes ópticos. Adicionalmente, este capítulo abrange os softwares que foram utilizados para o processamento e análise das imagens obtidas.

Capítulos 5 e 6: Nos capítulos cinco e seis, abordamos o desenvolvimento e a implementação da automação do sistema experimental, um passo essencial para otimizar a execução dos experimentos. Além disso, apresentamos e discutimos os resultados obtidos através das aplicações das técnicas de CARS e SRS em diferentes amostras, sendo esses nervos ópticos de camundongos, leishmânias e nervos trigêmeos. Cada conjunto de resultados é analisado, destacando as implicações científicas. Finalmente, esses capítulos incluem uma discussão das conclusões alcançadas e das perspectivas futuras, especialmente no que diz respeito ao uso de CARS e SRS nos materiais investigados.

2 Efeito Raman estimulado

2.1 Óptica não-linear

Durante a interação entre luz e matéria, ocorrem simultaneamente diversos efeitos com polarização induzida no meio devido a campos elétricos de diferentes ordens. Os efeitos de polarização de primeira ordem são os mais comuns, como o espalhamento Rayleigh, difração e espalhamento Raman [41]. Essa polarização pode ser descrita pela equação 2.1.

$$P_L(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} E(t), \quad (2.1)$$

onde, $P_L(t)$, representa o vetor de polarização linear, e $E(t)$ o vetor de campo elétrico, ϵ_0 representa a permissividade dielétrica do vácuo, enquanto $\chi^{(1)}$ representa o tensor de susceptibilidade elétrica linear do material que está relacionada com a polarização óptica e as respostas lineares do material.

A partir da equação 2.1, podemos notar a relação direta entre campo e polarização. Porém, ao aplicarmos um campo de alta potência, temos maior probabilidade de acessar fenômenos de polarização não linear, ou seja, aqueles que dependem das polarizações de ordem superior. Dessa forma, podemos escrever uma equação geral para a polarização da seguinte maneira :

$$P_{total}(t) = \epsilon_0(\chi^{(1)} E(t) + \chi^{(2)} E^2(t) + \chi^{(3)} E^3(t) + \dots), \quad (2.2)$$

$\chi^{(2)}$ é a susceptibilidade de segunda ordem e $\chi^{(3)}$ a de terceira ordem e assim por diante. Separando essa equação em dois termos temos [42] :

$$P_{total}(t) = P_L(t) + P_{NL}(t), \quad (2.3)$$

com $P_L(t)$ representando a parte linear da polarização e $P_{NL}(t)$ a parte não linear.

Neste trabalho vamos focar em técnicas que dependem da polarização de terceira ordem para isto, vamos entender melhor como ela funciona partindo dos termos de terceira ordem da equação 2.2:

$$P^{(3)}(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t), \quad (2.4)$$

que é induzida através de um campo de três componentes de frequências dado por:

$$E(t) = E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + E_3 e^{-i\omega_3 t} + c.c., \quad (2.5)$$

onde c.c. representa o complexo conjugado dos campos.

Assim quando substituimos a 2.5 em 2.4 podemos obter resultados com diversas frequências [43], sendo elas:

$$\omega_1, \omega_2, \omega_3, 3\omega_1, 3\omega_2, 3\omega_3, (\omega_1 + \omega_2 + \omega_3), (\omega_1 + \omega_2 - \omega_3), (\omega_1 + \omega_3 - \omega_2), (\omega_2 + \omega_3 - \omega_1)$$

$$(2\omega_1 \pm \omega_2), (2\omega_1 \pm \omega_3), (2\omega_2 \pm \omega_1), (2\omega_2 \pm \omega_3), (2\omega_3 \pm \omega_1), (2\omega_3 \pm \omega_2), \quad (2.6)$$

essas combinações são responsáveis por diversos fenômenos entre eles os que vamos falar a seguir e que são o foco da nossa pesquisa, chamados de espalhamento Raman coerente (CSR) do inglês *Coherent Raman scattering* e a mistura de quatro ondas (FWM) do inglês *four wave mixing* esses são efeitos que dependem do χ^3 do material.

2.1.1 Four-Wave mixing (FWM)

O FWM é um dos efeitos não-lineares notáveis em sistemas ópticos, conforme discutido por Boyd em [43]. Esse fenômeno envolve três ondas iniciais, se combinando para gerar uma quarta onda. Esse fenômeno é um exemplo de um processo não linear onde ocorre a geração de novas frequências. Especificamente, nele, temos a mistura de ondas que resulta na produção de uma nova onda com uma frequência diferente daquelas das ondas iniciais um diagrama representando isso pode ser observado na figura 1.

A figura 1 apresenta uma representação onde no caso **(a)** temos uma representação de $\omega_1, \omega_2, \omega_3$ se somando para formar um ω_4 e ao lado seu diagrama de conservação de

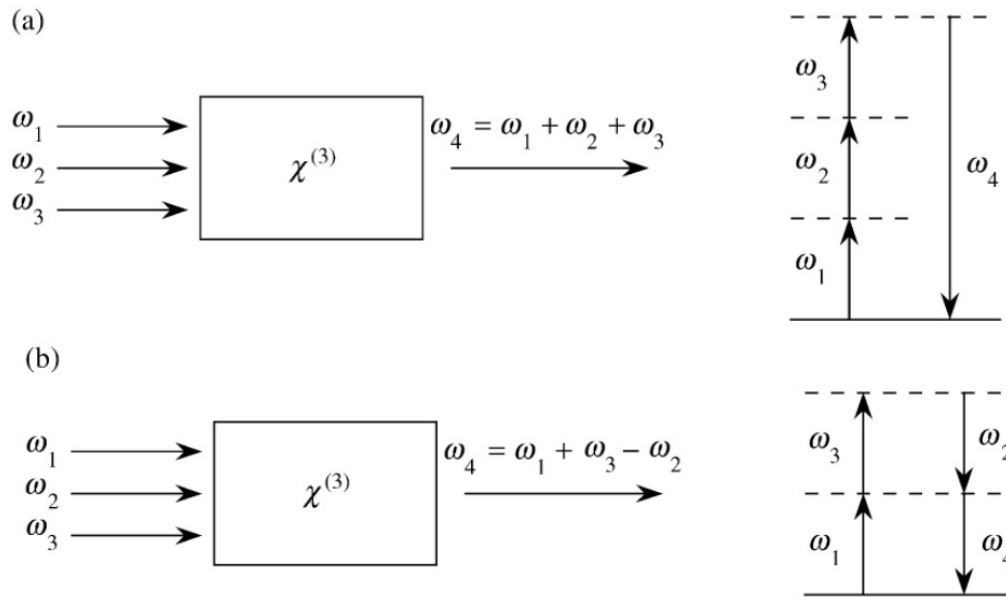


Figura 1 – Ilustração do processo de FWM e diagrama de conservação de energia, (a) para o caso onde $\omega_4 = \omega_1 + \omega_2 + \omega_3$ (b) para o caso onde $\omega_4 = \omega_1 + \omega_3 - \omega_2$ adaptado de [44].

energia, enquanto em (b) temos o caso onde ω_4 se forma através de $\omega_1 + \omega_3 - \omega_2$ e ao lado seu diagrama de conservação de energia.

Como dito acima todos os processos de somas e diferenças de três frequências que resultam em um FWM. Um dos casos de FWM é a mistura de quatro ondas degeneradas (DFWM) do inglês *degenerate four wave mixing*, esse processo ocorre quando duas frequências são iguais $\omega_1 = \omega_3$. Nesse trabalho vamos utilizar o caso degenerado onde $\omega_1 - \omega_2 = \omega_\nu$ onde ω_ν é a frequência de vibração do material esse caso é chamado de CARS e será detalhado na próxima seção.

2.2 Coherent Raman scattering

Para entendermos melhor o CRS precisamos compreender o efeito Raman, como citado na sessão 2.1 quando a luz incide em um material ou uma molécula uma parte da luz sofre um espalhamento elástico, chamado espalhamento Rayleigh [1]. Durante esse fenômeno a luz é desviada em diferentes direções, sem alterar sua energia ou frequência.

Contudo, uma pequena porção da luz incidente sofre um espalhamento inelástico. Nesse caso, ocorre uma interação entre a luz e as vibrações moleculares do material. Como resultado temos uma alteração na frequência emitida. Esse fenômeno se chama espalhamento Raman que pode ser dividido em dois casos o Stokes, que é quando temos uma perda de energia, nessa interação então, a frequência emitida é menor que a incidida.

A outra situação é chamado de anti-Stokes, que é quando temos um ganho de energia ou seja a frequência emitida é maior que a incidida [1]. Podemos observar esses fenômenos na figura 2.

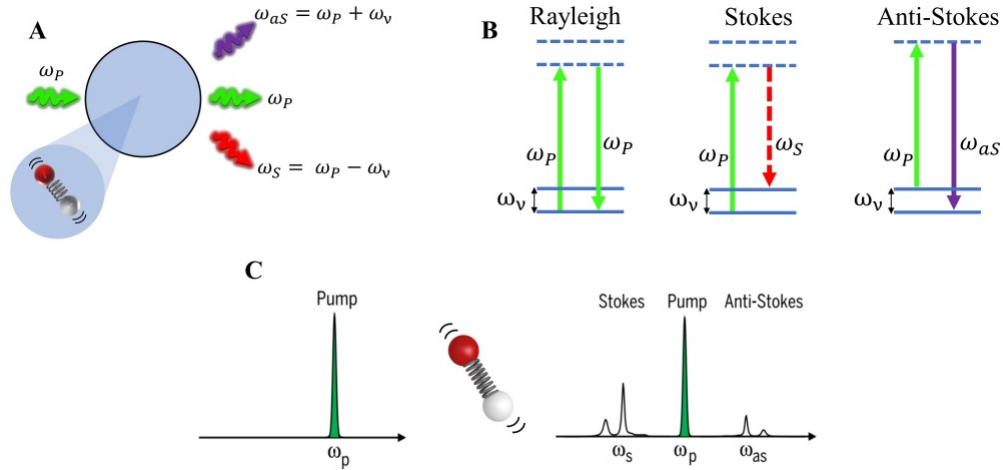


Figura 2 – A) Ilustração do espalhamento Rayleigh e Raman, onde vemos um feixe incidente ω_p , incidindo sobre uma molécula vibrando e espalhando um feixe ω_p (espalhamento elástico Rayleigh), um feixe ω_s (espalhamento Raman Stokes) e um ω_{as} (espalhamento Raman anti-Stokes) espalhados inelasticamente pela vibração molecular. B) Diagrama de energia do espalhamento Rayleigh e dos espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes. C) Ilustração de um espectro de um laser incidente (Pump) em uma molécula vibrando, demonstrando como seriam os picos relacionados ao espalhamento Stokes e anti-Stokes adaptado de [45].

Na figura 2 A) é representado o espalhamento da luz com uma frequência ω_p ao interagir com uma molécula de vibração ω_v que produz uma resposta de um campo anti-Stokes ($\omega_{as} = \omega_p + \omega_v$) e uma Stokes ($\omega_{as} = \omega_p - \omega_v$), em B) podemos observar o mecanismo físico associado ao espalhamento Raman de Stokes pode ser compreendido na imagem semi-clássica. No espalhamento Rayleigh da figura, a luz não é afetada pelos níveis vibracionais, produzindo luz com a mesma frequência incidente. No espalhamento Raman de Stokes, a luz espalhada adquire um componente deslocado para o vermelho, perdendo energia para o meio e deixando-o em um estado vibracional excitado. No espalhamento Raman anti-Stokes, o componente deslocado para o azul aparece devido à transferência de energia do meio para a luz incidente e em C) mostra a intensidade desses processos que esta ligada a probabilidade de cada um deles acontecer, assim podemos ver que o espalhamento Rayleigh é mais provável que o espalhamento Raman sendo o efeito Stokes mais provável que o Anti-Stokes.

O espalhamento Raman tem aplicações em diversas áreas [46–48], porém, na microscopia Raman, o tempo de exposição do material é um fator importante a ser considerado. Refere-se ao período de tempo em que a amostra está sendo exposta à radiação laser durante a aquisição das imagens.

Um tempo de exposição mais longo também pode levar a outros efeitos indesejados, como a degradação ou aquecimento da amostra devido à interação prolongada com o laser. Além disso, em amostras biológicas ou sensíveis à radiação, um tempo de exposição excessivo pode causar danos, reduzir a viabilidade celular ou modificar as propriedades físicas ou químicas do material.

Portanto, é importante encontrar um equilíbrio entre a duração da exposição e a qualidade dos dados desejados. Através de estudos e aperfeiçoamento de técnicas envolvendo o espalhamento Raman, foi desenvolvido o CRS. Uma técnica de microscopia vibracional que apresenta algumas vantagens em relação à técnica convencional. Uma dessas vantagens é o tempo de aquisição das imagens que ocorre pelo fato do SRS aproveita da coerência dos laser utilizados [5].

O CRS se diferencia por ser um efeito de polarização de terceira ordem, assim como o FWM. Isso significa que depende de campos com alta intensidade e do termo de susceptibilidade não linear de terceira ordem $\chi^{(3)}$. As principais técnicas de CRS são o espalhamento Raman estimulado (SRS) do Inglês *Stimulated Raman Scattering* e o já citado CARS [49].

2.2.1 Coherent Raman anti-stokes scattering

Como dito no final da seção 2.1.1 o CARS é um caso particular do DFWM onde temos duas condições principais nessa técnicas a primeira dessas é que seja um DFWM onde $\omega_1 = \omega_3$ e a outra $\omega_1 - \omega_2 = \omega_\nu$, onde ω_ν é a frequência vibracional do material estudado como podemos ver na figura 3

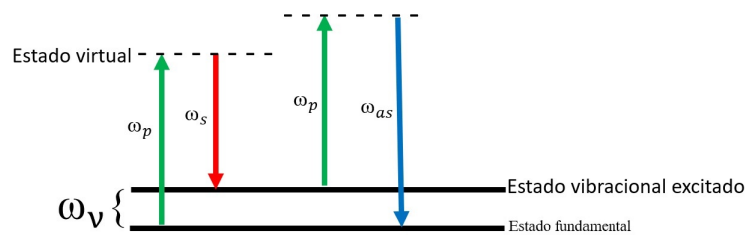


Figura 3 – Diagrama do processo do CARS adaptado de [50]

Na figura 3 podemos ver o diagrama de transição onde as setas azuis (ω_p), a seta amarela (ω_s) e a seta vermelha (ω_{as}) representam respectivamente as frequências dos campos elétricos pump, Stokes e anti-Stokes, observamos também os estados virtuais, esses são níveis que nos ajudam na compreensão do experimento, e o fundamental e o vibracional excitado que são estados reais ou seja níveis que podem ser observados e

ocupados, a diferença entre esses dois estados reais é a frequência vibracional do material (ω_ν).

Para entender melhor esse fenômeno vamos partir da descrição do campo elétrico [43] que nesse caso é dado por:

$$E(t) = E_p(t) + E_s(t) = E_p e^{-i\omega_p t} + E_s e^{-i\omega_s t + c.c.}, \quad (2.7)$$

com E_p e E_s sendo respectivamente o campo elétrico referente ao feixe pump e ao feixe Stokes, e ω_p e ω_s , também respectivamente as frequências de dos feixes pump e Stokes, agora utilizando a equação 2.2 e substituindo os campos elétricos temos:

$$\begin{aligned} P_{NL}(t) = & P(2\omega_p - \omega_s) e^{-i(2\omega_p - \omega_s)t} + P(2\omega_s - \omega_p) e^{-i(2\omega_s - \omega_p)t} \\ & + P(\omega_p) e^{-i\omega_p t} + P(\omega_s) e^{-i\omega_s t} + n.f.c. \end{aligned} \quad (2.8)$$

onde n.f.c são as componentes de frequências negativas (*Negative frequency components*). Já que a intensidade é proporcional ao módulo quadrado da polarização, podemos escrever:

$$I \propto |P_{NL}(t)|^2, \quad (2.9)$$

agora utilizando apenas o termo da polarização relacionado ao CARS ($P(2\omega_s - \omega_p)$) temos:

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |P(2\omega_p - \omega_s)|^2 \quad (2.10)$$

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |\chi^{(3)}|^2 |E_p|^2 |E_s^*|^2, \quad (2.11)$$

assim podemos ver que a intensidade da frequência ω_{CARS} vai depender de três fatores, os campos elétrico pump (E_p) e Stokes (E_s) e $\chi^{(3)}$. Com a ideia que os feixes são constantes durante o experimento o único fator que pode variar o valor da intensidade é o $\chi^{(3)}$ que pode ser descrito como uma soma entre o um termo ressonante ($\chi_r^{(3)}$), que refere-se a uma situação em que a frequência do campo elétrico incidente é próxima ou igual à frequência de ressonância do material. e o não ressonante ($\chi_{nr}^{(3)}$) que refere-se a uma situação em que a frequência do campo elétrico incidente não está próxima da frequência de ressonância do material [46]. Assim podemos escrever a equação 2.11 da seguinte forma:

$$I \propto |\chi^{(3)}|^2,$$

$$I \propto |\chi_r^{(3)} + \chi_{nr}^{(3)}|^2, \quad (2.12)$$

Para o caso de não ocorrer transições eletrônicas reais, podemos tomar $\chi_{nr}^{(3)}$ como constante pois é independente das configurações de frequência utilizada, porém para o $\chi_r^{(3)}$ podemos usar a descrição de um oscilador harmônico forçado com ressonância dos estados vibracionais da seguinte forma:

$$\chi_r^{(3)} = \frac{A}{(\Delta - i\gamma)}, \quad (2.13)$$

com $\Delta = \omega_p - \omega_s = \Omega_r$, sendo Ω_r a frequência do centro de um pico Raman do modo material estudado e γ é relacionado ao tempo de vida do nível vibracional e A uma amplitude arbitrária, assim podemos reescrever a equação 2.2.1 da seguinte forma:

$$I_{\omega_{CARS}} \propto |\chi_r^{(3)}|^2 + |\chi_{nr}^{(3)}|^2 + 2\chi_{nr}^{(3)} \text{Re}\{\chi_r^{(3)}\}. \quad (2.14)$$

Na figura 4 podemos observar o gráfico que representa a equação acima, podemos observar que na figura 4a, temos o comportamento de todos os termos da equação 2.14 onde $|\chi_r^{(3)}|^2$ é a curva sólida relativa a ressonância com o modo vibracional, o termo $|\chi_{nr}^{(3)}|^2$ é a linha pontilhada e $2\chi_{nr}^{(3)} \text{Re}\{\chi_r^{(3)}\}$ a curva pontilhada, já na 4b, vemos o comportamento da intensidade do CARS em função da variação de Δ . Isso mostra que a interferência entre os termos ressonantes e não ressonantes que formam a linha do CARS não se apresentam como uma Lorentziana, podendo formar linhas assimétricas, mas também pode se observar um aumento do sinal próximo as condições de ressonância com os modos vibracionais.

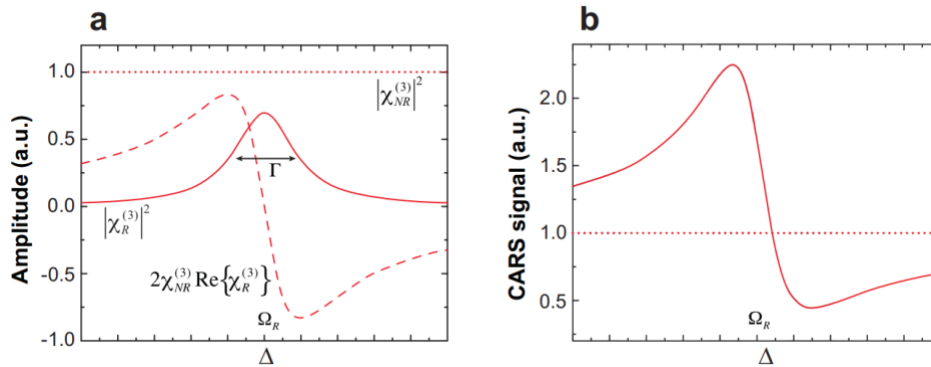


Figura 4 – Gráficos mostrando a relação da amplitude do sinal em relação à variação de Δ , (a) de cada termo da intensidade separadamente; (b) da intensidade total do CARS em relação ao background não ressonante $|\chi_{nr}^{(3)}|^2$ [46].

Com isso o CARS se apresenta como uma ferramenta muito útil para materiais que não podem ter muito tempo de exposição o que é extremamente relevante quando pensamos em materiais biológicos, pois com as configurações de laser corretas é possível aumentar o sinal anti-Stokes.

Contudo o CARS apresentar dificuldades dependendo da amostra. Isso ocorre devido a casos em que a parte ressonante da resposta do material é mais fraca em comparação

com a parte não ressonante. Essa disparidade na intensidade pode mascarar ou obscurecer a assinatura vibracional desejada presente no sinal do CARS.

Para superar essa limitação, pode-se usar o SRS, que é uma técnica alternativa que oferece uma abordagem para aprimorar a detecção da assinatura vibracional, independentemente da contribuição relativa entre as partes ressonante e não ressonante do material.

2.2.2 Stimulated Raman scattering

A técnica de SRS é uma forma de espectroscopia Raman que utiliza dois feixes laser para estimular o espalhamento Raman em uma amostra. Ela possui alta sensibilidade para detectar moléculas específicas em tecidos biológicos. Ao ajustar a frequência dos feixes laser, é possível direcionar a excitação para determinadas vibrações moleculares, permitindo a identificação e imagem de componentes específicos no tecido [51].

Além disso em relação a outras técnicas de imagem, como o CARS, que tem uma dependência com a relação da parte ressonante e não ressonante do material, a técnica de SRS oferece benefícios distintos, permitindo a obtenção de imagens de alta resolução tanto espacial quanto química em amostras biológicas, como tecidos. A capacidade de ajustar a frequência dos feixes laser proporciona uma seletividade precisa para diversos componentes moleculares, viabilizando a identificação e a visualização de moléculas específicas e estruturas subcelulares com uma sensibilidade notável.

Com essas particularidades apresentadas o SRS se oferece como uma alternativa promissora para a obtenção de imagens em tempo real e sem a necessidade de marcação de amostras. [52].

O SRS é um fenômeno que pode ser dividido em dois casos o Raman estimulado por perda (SRL) do inglês *Stimulated Raman Loss*, que é quando o campo Stokes interage com a vibrações moleculares da amostra, resultando em um perda de energia durante o processo, já o Raman estimulado por ganho (SRG) do inglês *Stimulated Raman Gain*, que ocorre com a interação do campo Stokes com as vibrações moleculares porém dessa vez ocorrendo um ganho de energia [53].

Ambos os efeitos, SRL e SRG, estão relacionados às frequências ω_p e ω_s utilizadas no SRS. As vibrações moleculares na amostra possuem frequências específicas, e o ajuste adequado das frequências dos feixes de pump e Stokes permite que ocorra uma interação ressonante com essas vibrações, desencadeando os efeitos de SRL e SRG [50].

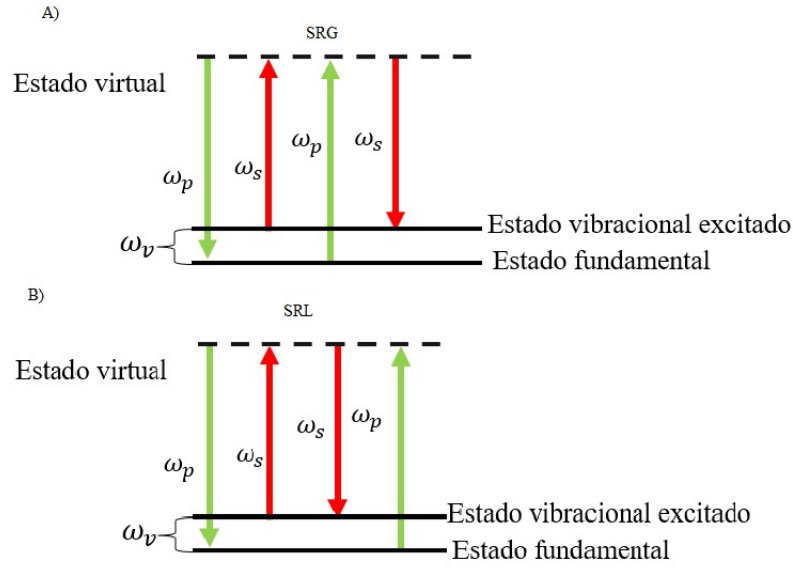


Figura 5 – Diagrama de energia dos processos SRS. (A) Diagrama de energia do SRG, onde temos três campos ($\omega_p, \omega_s, -\omega_p$) gerando uma quarta onda (ω_s). (B) Diagrama de energia do SRL, onde temos três campos ($\omega_p, \omega_s, -\omega_s$) gerando uma quarta onda (ω_p). Ambos efeitos no SRS são mediados por um modo vibracional de frequência (ω_ν) adaptado de [50].

Na figura 5(a) podemos observar o diagrama de energia do SRG. Nesse diagrama, são representados três campos: ($\omega_p, \omega_s, -\omega_p$). Esses campos correspondem a frequências dos feixes pump, Stokes e uma frequência negativa do pump, respectivamente. A interação desses três campos gera uma quarta onda, representada pela frequência ω_s . Esse processo de interação é mediado por um modo vibracional de frequência ω_ν , em (B) diagrama de energia do SRL: Nesse diagrama, também são representados três campos: ($\omega_p, \omega_s, -\omega_s$). Novamente, esses campos correspondem às frequências dos feixes pump, Stokes e uma frequência negativa de Stokes, respectivamente. A interação desses três campos gera uma quarta onda, representada pela frequência ω_s . Assim como no caso anterior, esse processo é mediado por um modo vibracional de frequência ω_ν .

Com isso, como referenciado em [42] podemos reescrever a equação 2.5 utilizando os campos SRG e SRL da seguinte forma :

$$E_{SRG}^{(3)} = E_s^{(3)} e^{-i\omega_s(t)} + c.c., \quad (2.15)$$

$$E_{SRL}^{(3)} = E_p^{(3)} e^{-i\omega_p(t)} + c.c., \quad (2.16)$$

e para as polarizações da equação 2.4 utilizando as componentes citas na figura 5, temos:

$$P_{SRG}^{(3)}(\omega_s) \propto \chi^{*(3)} E_p^2 E_s, \quad (2.17)$$

$$P_{SRL}^{(3)}(\omega_p) \propto \chi^{(3)} E_s^2 E_p, \quad (2.18)$$

para a intensidade SRS partindo da equação 2.9 temos:

$$I(\omega_s) \propto |E_s^{(3)} + E_s|^2 \propto |E_s^{(3)}|^2 + |E_s|^2 + 2\text{Re}\{E_s^{(3)}E_s^*\}, \quad (2.19)$$

$$I(\omega_p) \propto |E_p^{(3)} + E_p|^2 \propto |E_p^{(3)}|^2 + |E_p|^2 + 2\text{Re}\{E_p^{(3)}E_p^*\}, \quad (2.20)$$

com $E_s^{(3)}$ e $E_p^{(3)}$ sendo os campos não lineares induzidos e E_s e E_p os campos incidentes referentes a ω_s e ω_p , e com isso podemos ver que o campo induzido e o campo incidente interferem em ω_s e ω_p . O modulo quadrado de $E_s^{(3)}$ e $E_p^{(3)}$ são proporcional aos módulos quadrados de P_{ω_s} e P_{ω_p} , ou seja $|E_s^{(3)}|^2 \propto |P_{\omega_s}|^2$ e $|E_p^{(3)}|^2 \propto |P_{\omega_p}|^2$ podemos escrever as equações 2.19 e 2.20 da seguinte forma [54, 55]:

$$I(\omega_s) \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_s + I_s + 2\text{Re}\{E_s^{(3)}E_s^*\}, \quad (2.21)$$

$$I(\omega_p) \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p I_s^2 + I_p + 2\text{Re}\{E_p^{(3)}E_p^*\}, \quad (2.22)$$

onde $I_s \propto |E_s|^2$ e $I_p \propto |E_p|^2$ são as intensidades das componentes dos campos incidentes. As intensidades de $|E_s|^2$ e $|E_p|^2$ em comparação respectivamente com as intensidades de $|E_s^{(3)}|^2$ e $|E_p^{(3)}|^2$ são muito pequenas, normalmente não sendo medidas [54, 56]. Então podemos reduzir as equações 2.19 e 2.20 para [54, 56]:

$$I(\omega_s) \propto I_s + 2\text{Re}\{E_s^{(3)}E_s^*\} \quad (2.23)$$

$$I(\omega_p) \propto I_p + 2\text{Re}\{E_p^{(3)}E_p^*\} \quad (2.24)$$

Agora para determinar o papel dos termos de interferência podemos relacionando a polarização de ω_s e ω_p com o campo E_s^3 e E_p^3 :

$$iP(\omega_s) \propto E_s^{(3)}, \quad (2.25)$$

$$iP(\omega_p) \propto E_p^{(3)}, \quad (2.26)$$

fazendo as aproximações necessárias, podemos utilizar as equações 2.25 e 2.26 para reescrever as equações 2.19 e 2.20 ficando com:

$$I(\omega_s) \propto I_s + 2\text{Re}\{iP(\omega_s)E_s\}, \quad (2.27)$$

$$I(\omega_p) \propto I_p + 2\text{Re}\{iP(\omega_p)E_p\}, \quad (2.28)$$

substituindo as polarizações pelas equações 2.17 e 2.18 temos:

$$I(\omega_s) \propto I_s + 2I_s I_p \text{Re}\{i\chi^{*(3)}\}, \quad (2.29)$$

$$I(\omega_p) \propto I_p + 2I_s I_p \text{Re}\{i\chi^{(3)}\}, \quad (2.30)$$

por fim podemos achar a intensidade ω_s e ω_p relacionadas as intensidade do Stokes e pump pelas equações 2.31 e 2.32:

$$I_{SRG} = I(\omega_s) \propto I_s + 2I_s I_p \text{Im}\{\chi_r^{(3)}\}, \quad (2.31)$$

$$I_{SRL} = I(\omega_p) \propto I_p - 2I_s I_p \text{Im}\{\chi_r^{(3)}\}. \quad (2.32)$$

Através das equações 2.31 e 2.32, podemos compreender por que o SRG resulta em um ganho de intensidade, enquanto o SRL tem uma perda, em [45] temos um desenvolvimento teórico mais detalhado sobre essa técnica.

Neste trabalho, estaremos utilizando o SRL, o qual a partir de agora chamaremos de SRS.

3 Aplicações

Como dito nas seções anteriores, as técnicas desenvolvidas a partir do Raman, como o SRS e o CARS, possuem diversas aplicações. Em nosso grupo de pesquisa, estamos utilizando essas técnicas em várias áreas, incluindo a física aplicada a materiais biológicos e a medicina.

Neste capítulo, vamos realizar uma revisão da literatura científica que utilizam essas técnicas em materiais biológicos.

3.1 Aplicações em placas β -amilóide

Um exemplo dessas aplicações é o trabalho [57], que utiliza entre suas diversas técnicas o CARS e o SRS para caracterizar a proteína β -amilóide ($A\beta$) em tecidos cerebrais de modelos de camundongos com doença de Alzheimer (AD, do inglês *Alzheimer's disease*) sem a utilização de marcadores [57].

A utilização do CARS e do SRS permite a descrição e comparação de imagens de alta resolução das placas ($A\beta$) em tecidos cerebrais, possibilitando a identificação e análise da distribuição espacial de biomarcadores centrais que são substâncias ou moléculas específicas usadas como indicadores de processos biológicos, estados patológicos ou respostas a uma intervenção terapêutica para o caso desse estudo os marcadores centrais foram a fenilalanina e amida B dentro das placas [35, 58–62].

Através da caracterização das placas ($A\beta$) e da identificação dos biomarcadores centrais amida B e fenilalanina, foi possível obter-se informações sobre a distribuição espacial dos biomarcadores dentro das placas, que podem servir como indicadores potenciais para o diagnóstico precoce da DA.

O trabalho também apresenta as vantagens do CARS e do SRS em relação a outras técnicas, como por exemplo o Raman espontâneo (SPRs, do inglês *spontaneous Raman microscopy*). Algumas das vantagens, já citadas em capítulos anteriores, incluem as imagens de alta resolução e o curto tempo de aquisição de imagens, o que permite a visualização das placas $A\beta$ [63–68]. A combinação dessas técnicas permite que os pesquisadores explorem diferentes regiões das placas para aplicações diagnósticas.

As imagens da Figura 6 mostram comparações de imagens SRS e SPRs para várias frequências vibracionais, variando entre 1007cm^{-1} até 2930cm^{-1} , que são os modos

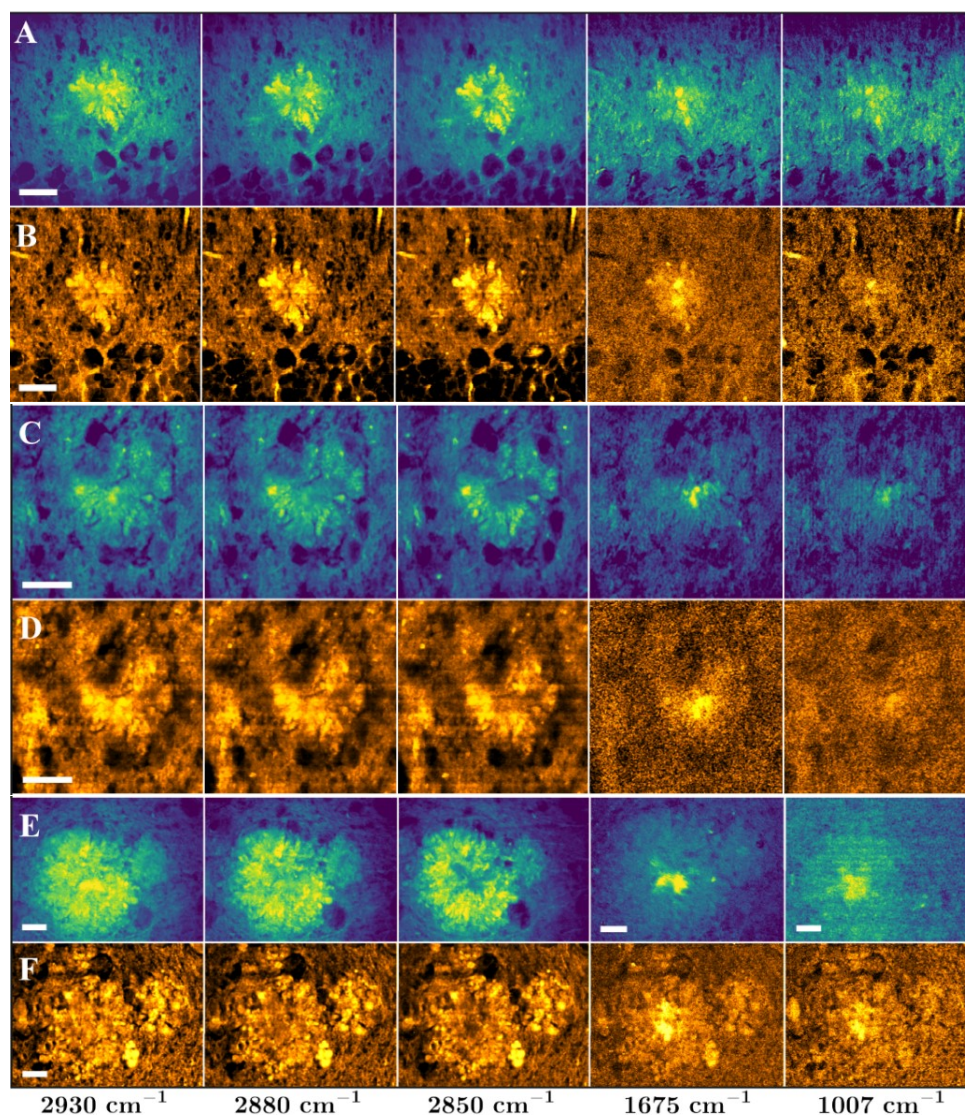


Figura 6 – Comparação entre a microscopia Raman estimulada de banda estreita e a microscopia Raman espontânea em diferentes geometrias de dispersão. Três placas diferentes de ($A\beta$) foram imageadas por SRS (A, C, E) e SpRS hiperespectral (B, D, F), obtidas em diferentes energias vibracionais, conforme listado na parte inferior das imagens. Todas as barras de escala são de 20 μm . Imagens sem uma barra de escala compartilham a barra de escala da imagem mais à esquerda na mesma linha [57].

vibracionais das placas ($A\beta$) localizadas em diferentes regiões do cérebro, como o hipocampo e o córtex.

A Figura 6 demonstra a superioridade do SRS, mostrando imagens mais claras, com maior contraste e menor interferência de fundo que se da pela capacidade do SRS de fornecer imagens químicas específicas ao selecionar energias vibracionais correspondentes a modos vibracionais específicos dos biomarcadores de interesse, como fenilalanina e amida B. Isso resulta em uma caracterização mais precisa dos componentes químicos dentro das placas, o que corrobora com a conclusão do trabalho que mostra que foi estudado o núcleo e o halo das placas ($A\beta$), mostrando que SpRS e SRS produzem imagens idênticas, permitindo combinar informações de espectroscopia Raman com vantagens da SRS. Além

disso com a utilização do CARS e o SRS foram identificados biomarcadores de halo baseados em lipídios insaturados e dois novos biomarcadores de núcleo (fenilalanina e amida B), com a amida B permitindo imagens com maior taxa de aquisição, sugerindo sua utilidade para diagnóstico de placas de $(A\beta)$.

3.2 Aplicação em câncer

Aplicações de CARS e SRS também apresentam diversas aplicações em diagnósticos em diversos tipos de câncer [69–72]. Entre eles a pesquisa de de Sivasubramanian Murugappan *et al* [73], que apresenta aplicações de CARS e SRS para o diagnóstico de câncer no cérebro.

Neste trabalho os autores apresentam as dificuldades para o diagnóstico e monitoramento de câncer cerebral, o que resulta em altas taxas de mortalidade e baixa sobrevivência [73].

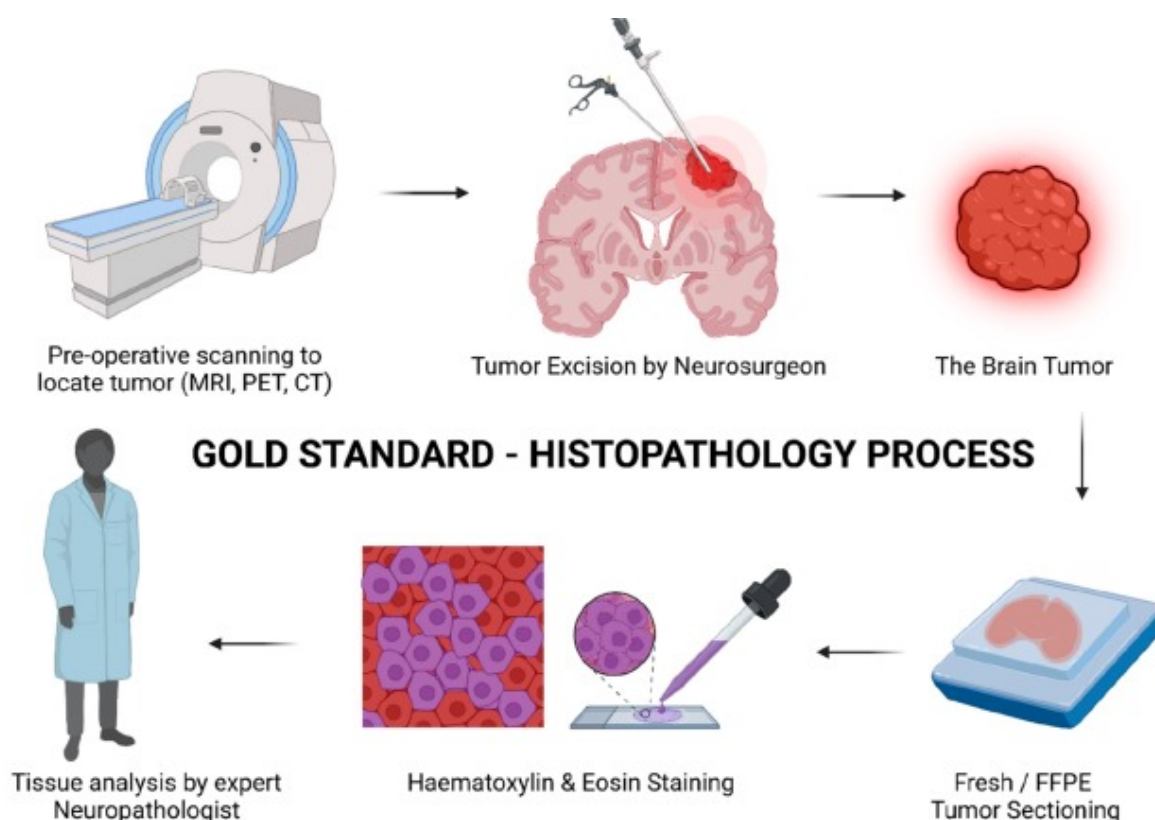


Figura 7 – Representação esquemática do longo e tedioso processo de histopatologia. Os pacientes precisam passar por uma varredura inicial para identificar o tumor. Em seguida, é realizada uma seção da amostra, que passa por várias etapas de processamento que demoram mais tempo e precisam ser confirmadas por um neuropatologista, o que aumenta as chances de erro. Um erro ou a remoção parcial do tumor leva a cirurgias invasivas, afetando novamente a saúde e a qualidade de vida do paciente [73].

Na figura 7 é mostrado um processo esquemático detalhando o procedimento padrão de histopatologia para a identificação e análise de tumores cerebrais. Ele segue os seguintes passos varredura Pré-operatória, primeiramente, os pacientes passam por exames de imagem, como ressonância magnética, tomografia por emissão de pósitrons ou tomografia computadorizada, para localizar o tumor. Em seguida um neurocirurgião realiza a excisão do tumor localizado no cérebro, após a localização do tumor cerebral as imagens do tumor cerebral são destacadas após a excisão. Por fim o tumor é dividido em seções frescas ou fixadas em formol, as seções são coradas usando hematoxilina e eosina para destacar as estruturas celulares e um neuropatologista especialista analisa as amostras de tecido coradas.

O processo descrito é detalhado e minucioso, demandando tempo significativo. Além disso, requer confirmação por um neuropatologista, o que pode aumentar a possibilidade de erros. Se houver erro ou remoção parcial do tumor, isso pode levar a novas cirurgias invasivas, comprometendo a saúde e a qualidade de vida do paciente.

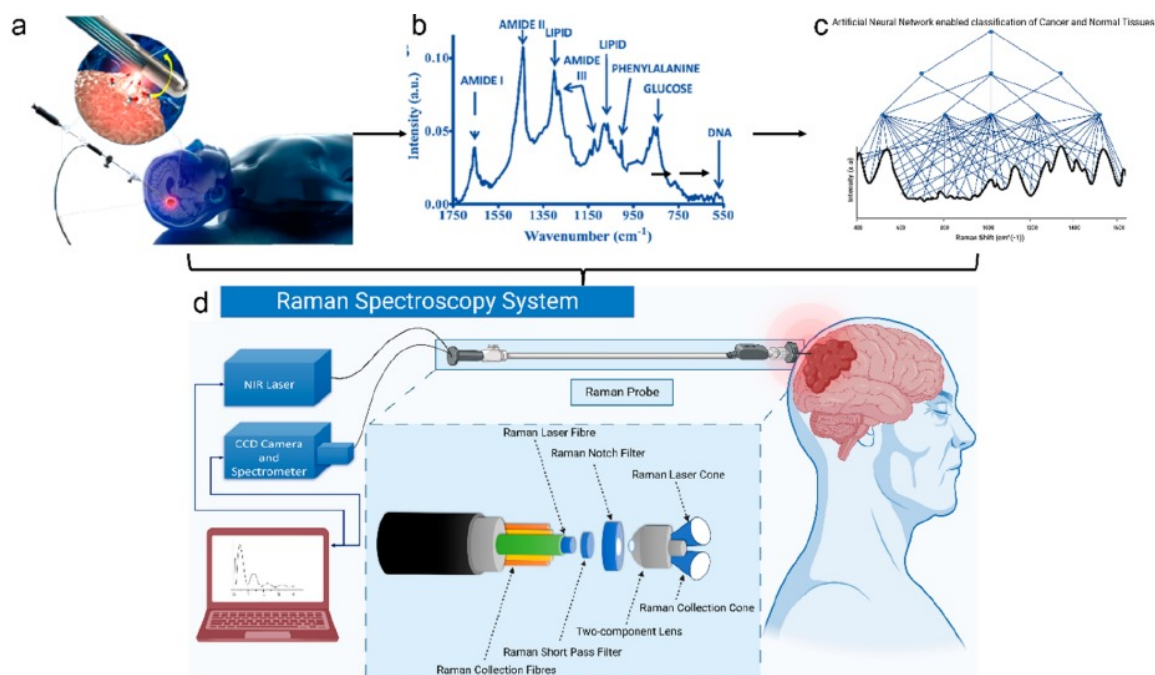


Figura 8 – Representação esquemática do processo de espectroscopia Raman. Temos em (a) A sonda de laser Raman é usada sobre a amostra [74], (b) Os espectros Raman que são fornecidos pelo estudos [75], (c) Este processamento, usando o modelo computacional, distingue entre espécimes tumorais e normais, (d) O sistema completo contendo todos esses componentes é o conjunto de espectroscopia Raman [73]

A figura 8 representa o processo de espectroscopia Raman, detalhado em quatro partes principais. Na parte superior esquerda (a), a sonda de laser Raman é aplicada diretamente sobre a amostra. Este procedimento é ilustrado com uma imagem mostrando a aplicação da sonda em um tecido cerebral [74]. A seguir, a imagem (b) mostra um gráfico dos espectros Raman obtidos, que indicam a intensidade de diferentes componentes químicos presentes na amostra. Picos específicos são marcados, como amida I, amida II, lipídios, fenilalanina, glicose e DNA [75]. Em (c), a seção ilustra como o processamento dos espectros Raman, usando um modelo computacional (rede neural artificial), pode distinguir entre tecidos tumorais e normais. Um gráfico exemplifica a classificação realizada pelo modelo, destacando a separação entre as diferentes amostras. Na parte inferior da imagem (d), o sistema completo de espectroscopia Raman é mostrado, incluindo todos os componentes necessários. Este sistema é composto por um laser de infravermelho próximo, uma câmera CCD e um espectrômetro, todos conectados a um computador para análise dos dados.

A configuração detalhada do sistema é ilustrada, mostrando como a sonda Raman coleta e transmite os dados para processamento e análise. Baseado nessa maior facilidade na aplicação das técnicas Raman, o artigo apresenta algumas opções de técnicas para serem utilizadas, entre elas o CARS e o SRS, como opção para o diagnóstico e monitoramento

do câncer cerebral.

O CARS foi utilizado para diferenciar entre tecidos tumorais e normais com base na banda alifática de CH_2 que refere-se à vibração específica de grupos metileno presentes em compostos orgânicos. Esses grupos são comuns em lipídios e outras moléculas biológicas, fornecendo alta seletividade química [76, 77]. Especificamente, a CARS mostrou-se eficaz na distinção entre glioblastoma e metástases cerebrais, apresentando sinais de menor intensidade nos tecidos tumorais devido ao conteúdo lipídico reduzido [78]. O mapeamento CARS de regiões tumorais em tecidos cerebrais de camundongos detectou regiões de infiltração com precisão, codificadas por cores com base em informações patológicas, alinhando-se bem com amostras coradas com Hematoxilina-Eosina [79].

Por outro lado, a SRS foi utilizada para diferenciar entre tecidos neoplásicos e não neoplásicos em modelos de camundongos, tanto *ex vivo* quanto *in vivo*, alcançando uma alta precisão de correspondência de aproximadamente 98% [80]. Além disso, a SRS também foi usada para histologia Raman estimulada (SRH) para identificar margens tumorais em amostras de tecido cerebral, demonstrando altos níveis de sensibilidade e especificidade [81].

Em consonância com isso, é mostrada a integração de sistemas de imagem SRS com técnicas avançadas, como resolução de curva multivariada (MCR) do inglês *multivariate curve resolution* e máquinas de vetor de suporte quadráticas (SVM) do inglês *support vector machines*, permitindo a coloração histológica virtual em amostras de glioblastoma. Esse processo auxilia na classificação de subtipos, aprimorando as capacidades diagnósticas da espectroscopia Raman na pesquisa do câncer cerebral. As técnicas CARS e SRS fornecem recursos de caracterização e discriminação molecular, permitindo a identificação precisa das regiões tumorais nos tecidos cerebrais e a classificação precisa dos subtipos de glioblastoma.

A precisão de correspondência alcançada utilizando CARS e SRS na discriminação entre tecidos neoplásicos e não neoplásicos em amostras de tumor cerebral foi de aproximadamente 98% em comparação com métodos tradicionais de coloração. Este alto nível de precisão demonstra a eficácia da espectroscopia Raman, particularmente CARS e SRS, em fornecer caracterização molecular precisa e classificação de diferentes tipos de tecido na pesquisa do câncer cerebral.

Por fim, conclui-se que a espectroscopia Raman, especialmente através das técnicas CARS e SRS, mostra-se como uma poderosa ferramenta na luta contra o câncer cerebral. Sua capacidade de fornecer diagnósticos precisos e em tempo real, combinada com a alta sensibilidade e especificidade, a torna uma tecnologia promissora para melhorar significativamente as taxas de sobrevivência e reduzir as taxas de mortalidade associadas a esta doença devastadora. A integração de métodos avançados de análise de dados com SRS, como MCR e SVM quadrático, reforça ainda mais seu potencial, permitindo coloração histológica virtual e classificação detalhada de subtipos de tumores cerebrais, essencial

para tratamentos personalizados e eficazes.

3.3 Aplicação em DNA

O artigo *Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy* de Fa-Ke Lu *et al.* [82] apresenta o SRS como um método para visualizar o DNA sem o uso de marcadores, o que é significativo para aplicações biológicas e médicas, especialmente para exames histológicos em tempo real durante cirurgias [83]. O método distingue o DNA com base em suas características espectrais únicas de Raman, separando-o de proteínas e lipídios através de três frequências de vibrações diferentes: 2.967 cm^{-1} (DNA), 2.926 cm^{-1} (proteína) e 2.850 cm^{-1} (lípidos).

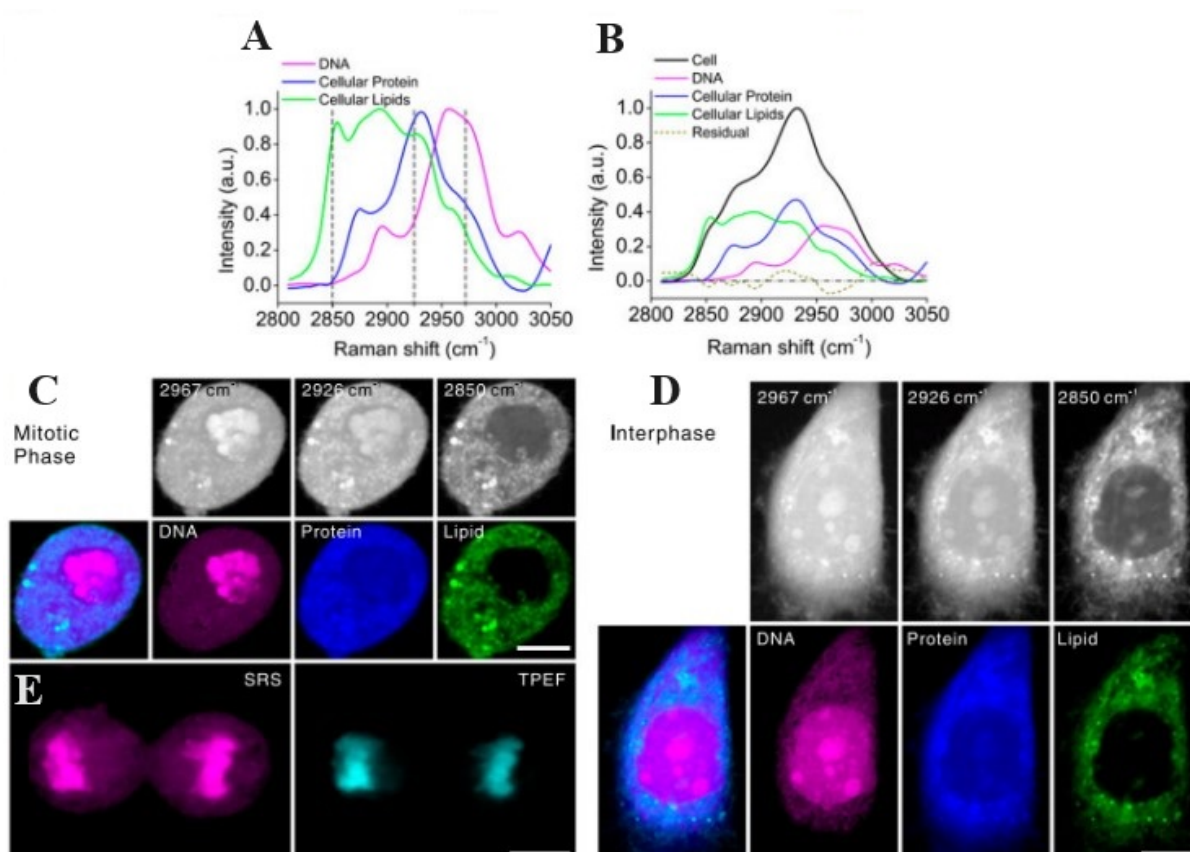


Figura 9 – Imagens SRS sem marcação de DNA (magenta), proteínas (azul) e lipídios (verde) em células vivas. Foram adquiridas imagens SRS em três deslocamentos Raman selecionados na banda vibracional de alongamento CH. A decomposição linear foi realizada com uma matriz de calibração previamente medida para recuperar a distribuição de DNA, proteínas e lipídios [82].

Na figura 9 temos imagens de SRS e TPEF das células estudadas, (A) Espectros Raman de DNA, proteína celular e lipídios celulares extraídos de células HeLa, (B) Espectro Raman do pellet de células. O ajuste linear demonstrou que os três compostos

em B representavam aproximadamente 90% da vibração de alongamento CH total das células, (C) Imagens SRS de uma célula viva em fase mitótica (prófase) a 2,967, 2,926 e 2,850 cm^{-1} , respectivamente, e a distribuição decomposta de DNA, proteína, lipídios e a sobreposição. Os cromossomos foram visualizados com alto contraste e alta relação sinal-ruído, (D) Imagens SRS de uma célula viva em interfase e a distribuição decomposta de DNA, proteína, lipídios e a sobreposição. Detalhes internos das características nucleares foram revelados claramente, (E) Imagens com SRS e TPEF de uma célula mitótica corada com DRAQ5, que se correlacionaram muito bem entre si. A barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$.

No artigo é apresentado um método que permite a visualização do DNA sem a necessidade de marcadores fluorescentes ou outros tipos de rótulos químicos. Isso é significativo porque os rótulos tradicionais podem interferir na função celular ou exigir a criação de organismos geneticamente modificados [84]. Além disso, o método desenvolvido viabiliza a captura da dinâmica dos cromossomos durante a divisão celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* [82]. No estudo, os pesquisadores demonstraram essa capacidade rastreando a propagação de células da pele de camundongos, induzida por tratamento com medicamentos. A microscopia SRS permitiu observar em tempo real os processos de condensação, alinhamento e separação dos cromossomos, fornecendo uma visão detalhada das fases da mitose [85]. Essa capacidade de visualizar eventos celulares complexos em organismos vivos é crucial para entender processos biológicos fundamentais e pode auxiliar no desenvolvimento de terapias direcionadas para doenças relacionadas à divisão celular desregulada.

Como conclusão, o artigo apresenta a eficácia e o potencial transformador do SRS na visualização de DNA e outras biomoléculas em tecidos vivos sem a necessidade de rótulos. A capacidade de distinguir o DNA com precisão, observar a dinâmica da divisão celular em tempo real e diagnosticar câncer de pele de forma rápida e sensível, ressalta as vantagens únicas desta técnica sobre os métodos tradicionais. O SRS não apenas oferece imagens de alta resolução, mas também proporciona uma abordagem não invasiva e eficiente, que pode ser aplicada em diversos contextos biológicos e médicos. A implementação dessa técnica em ambientes clínicos pode melhorar significativamente os diagnósticos, permitindo intervenções mais rápidas e precisas. Além disso, a habilidade de realizar estudos dinâmicos em tempo real abre novas possibilidades para a pesquisa biomédica, facilitando uma compreensão mais profunda dos processos celulares e moleculares. Em suma, a microscopia SRS representa um avanço significativo no campo da imagem biomédica, com um vasto potencial para revolucionar tanto a pesquisa quanto a prática médica.

Outros trabalhos que também utilizam o SRS e CARS para materiais biológicos podem ser vistos nas referências [86–88], o que mostra a eficiência e importância dessas técnicas, que será de extrema importância para este trabalho.

4 Metodologia

4.1 Montagem experimental

Através da montagem utilizada para esta dissertação, é possível separar os fatores comuns entre os efeitos do que é específico do SRS e CARS. Essa diferenciação é apresentada principalmente no momento da detecção dos sinais, onde se separa o sinal CARS do sinal SRS.

A figura 10 apresenta a montagem experimental utilizada neste trabalho.

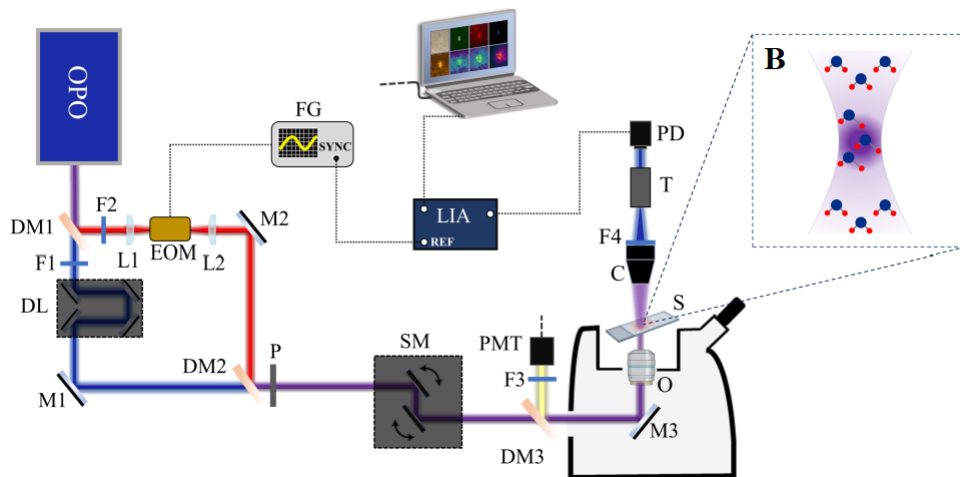


Figura 10 – (A) A montagem experimental utilizada para CARS e SRS, (B) uma ilustração da imagem formada adaptado de [45]

Podemos ver na figura 10 a luz pulsada proveniente do laser com cavidade OPO, que opera com um comprimento de onda fixo de 1064 nm (Stokes) e um sintonizável que varia entre 800 nm e 960 nm (pump), em vermelho e azul respectivamente. O espelho dicróico *short-pass* de 1000 nm (DM1) divide os feixes, refletindo o Stokes e transmitindo o pump. Os filtros (F1) *short-pass* de 1010 nm e (F2) *long-pass* de 1020 nm garantem a separação dos feixes sem contaminação. As lentes plano-convexas (L1, L2) com distância focal de 100 mm focam os feixes e a lente L2 colima o feixe. O modulador eletro-óptico (EOM) ressonante a 10 MHz gera uma alta frequência que altera a polarização de vertical para horizontal com uma taxa de 10MHz. Os espelhos planos de prata (M1, M2, M3) direcionam os feixes, e a plataforma de linha de atraso (delay line) com quatro espelhos planos de prata assegura a sincronização temporal dos dois feixes no segundo espelho dicróico. O espelho dicróico *short-pass* de 1000 nm (DM2) une os feixes, e o polarizador Linear (P) esse polarizador fazer a modulação em amplitude do feixe cortando Uma das polarizoes geradas pelo EOM. O sistema de varredura (SM), o espelho dicróico *long-pass*

substituível (DM3) redireciona o feixe para a PMT, o microscópio invertido, a objetiva (O), a amostra (S), o condensador (C), o filtro *band-pass* de 830/310 nm (F4), o telescópio (T), o fotodiodo (PD), o amplificador lock-in sincronizado a 10 MHz (LIA), o gerador de função com onda de 10 MHz (FG) e o filtro *band-pass* centrado em 661 nm (F3) usado para selecionar o sinal CARS, diminuindo o background devido a PL de dois fótons, e a fotomultiplicadora (PMT) completam a configuração.

Utilizando essa configuração, podemos obter o sinal CARS, que é direcionado para a fotomultiplicadora pelo DM3, passando pelo F3 que seleciona o sinal CARS e diminui o background vindo da PL. O sinal SRS é coletado pelo colimador, passa por um filtro F4 para eliminar a componente Stokes do feixe, e o telescópio reduz o movimento do feixe na área do detector do fotodiodo, que, com a ajuda do amplificador lock-in, extrai o sinal SRS e é acoplado ao fotodiodo e conectado ao EOM através da porta de sincronização do FG com esse sinal garantimos que o lock-in irá detectar apenas intensidade em 10 MHz.

Com essa montagem, conseguimos as imagens de SRS e CARS que serão utilizadas neste trabalho. As imagens são obtidas pelo ImSpector Pro do microscópio Lavisson e, após isso, são levadas ao processo de tratamento de imagens.

4.2 Preparação

4.2.1 Amostras

Os cortes dos nervos ópticos e trigêmeo, bem como as leishmânias, foram obtidos e preparados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) pelos nossos colaboradores. A preparação das amostras para serem levadas ao microscópio foi feita seguindo os passos abaixo:

- Passo 1: Em uma placa de Petri, foi adicionada água deionizada para criar um ambiente adequado para a preparação das amostras.
- Passo 2: A amostra foi adicionada em uma lâmina de vidro e mergulhada na água por um período de 5 minutos para assegurar a adequada hidratação.
- Passo 3: A lâmina foi retirada da água, permitindo que escorra um pouco, mas mantendo uma fina camada de água sobre os cortes, especialmente.
- Passo 4: Com o auxílio de uma pinça, posicionou-se cuidadosamente uma lamínula longa sobre a amostra, certificando-se de que os cortes estejam completamente hidratados para garantir uma preparação ideal.

Este procedimento visa criar condições propícias para a análise microscópica das amostras, assegurando resultados precisos e detalhados.

4.2.2 Sistema

Preparamos o sistema sintonizando nosso laser de bombeamento nas frequências desejadas. Para este trabalho, as seguintes frequências foram definidas: 811 nm (estiramento CH_3 de proteína e lipídio), 814 nm (estiramento CH_2 de proteína e lipídio), 816 nm (estiramento CH_2 de lipídio), 903 nm (vibração Amida I - estiramento $C=O$) e 961 nm (vibração do anel aromático da fenilalanina) [42]. Em seguida, configuramos nosso programa de automação, que nos permite definir o número de imagens que desejamos obter. Mais detalhes serão fornecidos na seção 5.1.1.

4.2.3 Análise de dados

Para a análise de dados, empregamos o *software* ImageJ, um *software* de código aberto utilizado para processamento de imagens. Essa ferramenta nos possibilitou realizar reconstruções tridimensionais, editar imagens, realizar medidas dos elementos presentes nas imagens, além de outras funcionalidades.

5 Resultados e Discussões

5.1 Implementação de imageamento por SRS em grandes áreas

Por esses motivos, durante este trabalho, iniciamos a automatização dos estágios de translação do microscópio, esse processo será detalhado na seção 5.1.1. O estágio de translação utilizado possui opções de deslocamento de $130 \times 100mm$ ou $250 \times 100mm$. Ele conta com codificadores lineares de 1 nm de resolução, fornecendo uma precisão de 5 μm , repetibilidade de 500nm e movimento incremental mínimo de 50nm. Seus motores lineares ultra silenciosos permitem uma velocidade máxima de 750mm/s e são isentos de manutenção. O controlador embutido economiza espaço e simplifica o gerenciamento de cabos. Há também uma interface digital de entrada/saída para acionamento de sistemas externos.

5.1.1 Automatização

Conforme apresentado anteriormente, as técnicas CARS e SRS oferecem diversas vantagens na análise e caracterização de materiais biológicos. Essas técnicas são especialmente úteis devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a composição química e estrutural dos materiais estudados. No entanto, os materiais biológicos frequentemente possuem dimensões muito maiores em comparação com a dimensões de área de imageamento dos sistemas de imagem utilizados como por exemplo a retina e cérebros de camundongos, o que pode representar um desafio significativo na obtenção de dados precisos e detalhados.

Para superar esse desafio, um dos passos cruciais do deste trabalho foi a automatização do sistema de medidas. Utilizando um código Python (Apêndice ??), programamos o estágio para se movimentar automaticamente nas direções x e y conforme a necessidade de cada amostra. Essa automação aumentou a eficiência do processo de coleta de dados, permitindo um mapeamento mais detalhado e abrangente das amostras. A implementação desse sistema automatizado requer um entendimento tanto da programação quanto da mecânica dos movimentos do estágio.

Na Figura 11, é ilustrada a movimentação do estágio automatizado, nela cada quadrado representa uma imagem xy sendo realizada, conforme a programação feita ao concluir a imagem o estagio faz um movimento em x ou y realizando assim uma nova imagem em xy e assim sucessivamente até o fim do processo de varredura.

Na figura 11 PI representa a posição inicial da varredura e PF a posição final

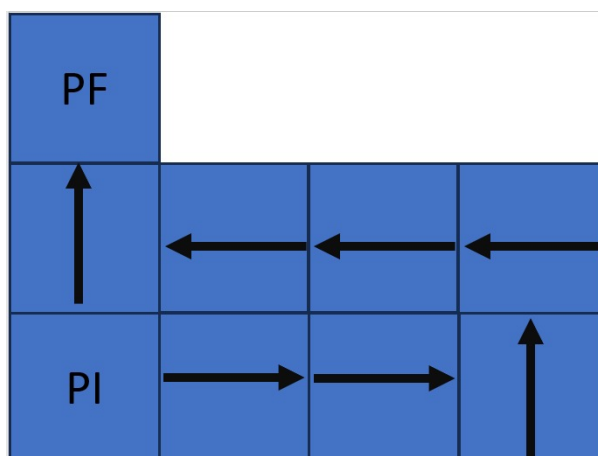


Figura 11 – Esquema de movimentação do estagio.

do ciclo, o número de passos, tanto em x quanto em y, pode ser ajustado conforme as necessidades específicas de cada amostra, além disso é possível programar um número de ciclos necessários para a varredura completa do material. Essa flexibilidade é essencial para lidar com a diversidade de tamanhos e formas das amostras biológicas, garantindo que toda a área de interesse seja coberta de maneira eficiente.

Para demonstrar a eficiência e a eficácia do sistema automatizado desenvolvido, na seção 5.1.2 serão apresentados os testes realizados nas amostras. Esses testes evidenciarão a precisão dos movimentos automatizados e a qualidade dos dados obtidos, confirmando que a automação do sistema de medidas não só facilita o processo, mas também melhora significativamente os resultados da análise.

5.1.2 Testes

Para realizar as medidas automatizadas, foi necessário sincronizar o tempo de medida com o tempo de espera para que o movimento acontecesse. Para isso, utilizamos dentro do programa de medidas *InspectPro* a função *time-time*, onde conseguimos definir um tempo para que cada medida aconteça. Então, ao programarmos isso e sincronizarmos o tempo de espera entre cada passo, tentamos garantir que a medida não ocorra antes do posicionamento correto. Além disso, foi adicionado uma sobreposição entre duas imagens repetindo o final de uma ao início da outra, para que, através da junção das imagens, não se perca nenhuma informação.

Para a validação da eficiência do sistema, foram feitos testes aumentando o tamanho da varredura realizada. O primeiro teste foi uma medida CARS de corte transversal de nervo óptico, conforme mostrado na Figura 12, onde foram necessários dois passos em x e nenhum em y. Por se tratar de uma varredura curta, o sistema entregou o que se esperava, produzindo uma imagem de qualidade.

Na Figura 12, temos as três imagens realizadas com a, b, c, sendo os respectivos passos realizados pelo sistema, resultando no corte completo.

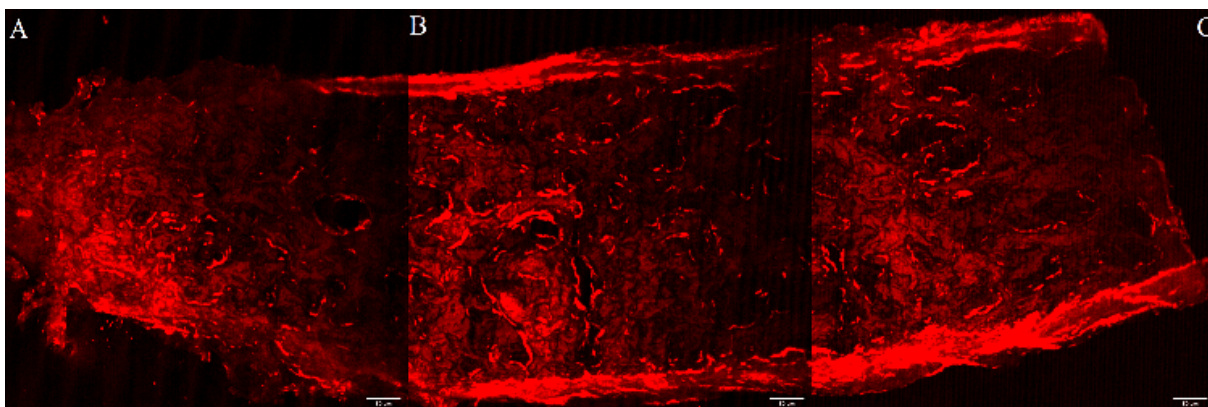


Figura 12 – Imagem de CARS do nervo óptico em corte transversal com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , em A) primeira imagem B) segunda imagem C) terceira imagem com barra de escala de $50\mu\text{m}$.

A Figura 13 também apresenta uma medida CARS realizada em um nervo óptico, porém em um corte longitudinal. Nessa medida, foi estabelecido que o movimento seria de um passo em x e um passo em y com duas repetições do movimento, cobrindo toda a superfície do corte. Novamente, o sistema permitiu realizar uma varredura completa e entregar uma imagem detalhada do nervo óptico, sem perda de informações. Esse sucesso é significativo, pois a precisão no mapeamento do nervo em cortes longitudinais permite uma análise mais profunda das suas características estruturais e funcionais ao longo de todo o seu comprimento. A capacidade do sistema de executar essas varreduras complexas de forma autônoma demonstra sua eficácia, destacando seu potencial para aplicações em estudos detalhados de tecidos nervosos e outros materiais biológicos.

Por fim, aplicamos o teste com maior número de imagens, onde, para medir células de leishmânias espalhadas na lâmina, foi determinado um movimento de oito passos em x e um passo em y, repetindo essa sequência por três vezes, gerando um total de 45 imagens. Veja a Figura 14, que apresenta uma montagem feita utilizando o *ImageJ*, organizando as imagens e formando a Figura 14.

Para esse último teste, o sistema apresentou um pequeno problema de sincronia entre os passos dados pelo estágio e o tempo de medida, fazendo com que o estágio se movimentasse um pouco antes que a medida terminasse de ser feita, gerando cortes nas imagens que foram corrigidos ao aumentar a sobreposição estabelecida no início. Porém, isso pode gerar um problema maior caso utilizemos áreas de varredura maiores, as correções sobre essas automações ficam como uma perspectiva futura desse trabalho 6.2 .

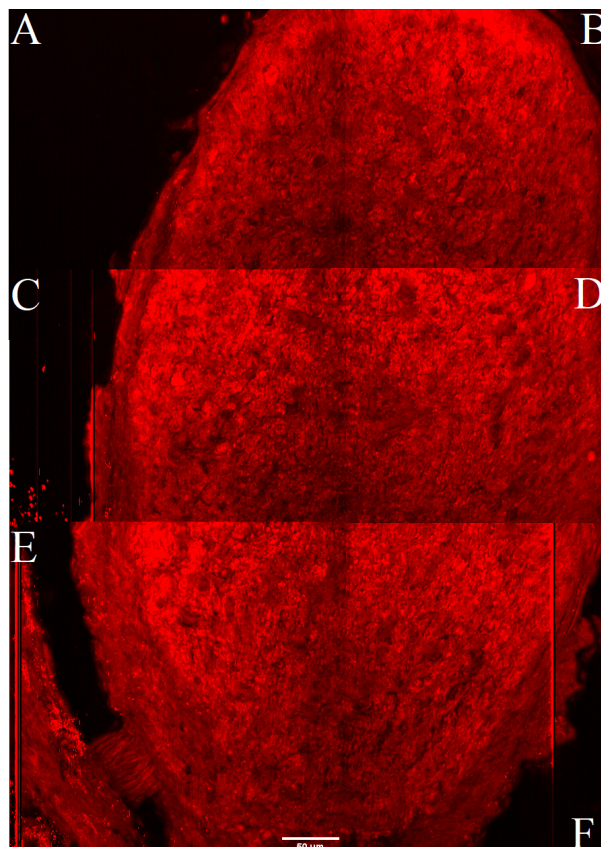


Figura 13 – *Stitch* de imagem CARS do nervo óptico em corte longitudinal com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com A, B, C, D, E e F são respectivamente a sequencia de imagens do *stitch* com barra de escala de $50\mu\text{m}$

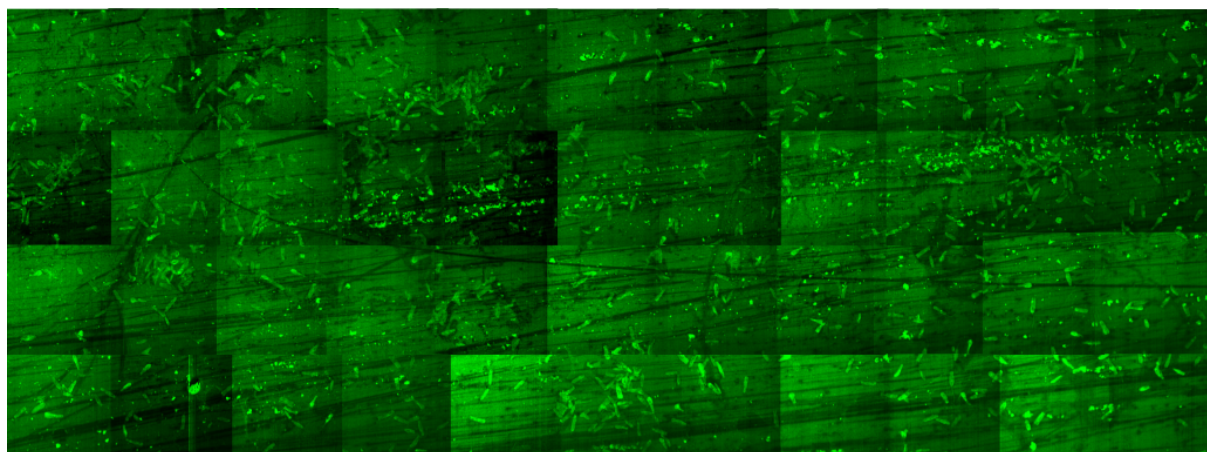


Figura 14 – Montagem de 45 imagens de Leishmânia com frequência vibracional excitada em 2932cm^{-1} , com uma barra de escala de $100\mu\text{m}$.

5.2 Aplicações e Resultados

Conforme mencionado na introdução desta dissertação, abordaremos as aplicações do espalhamento Raman coerente o SRS e o CARS. Durante esta seção, apresentaremos

e discutiremos os resultados obtidos através da utilização dessa técnica em diferentes contextos biológicos. Especificamente, investigamos , cortes de nervos ópticos de camundongos com degeneração Walleriana, amostras de nervos ópticos associadas à doença de Huntington, nervos trigêmeos e Leishmanias.

5.2.1 Degeneração Walleriana

Para a análise da WD, foram utilizados nervos ópticos de camundongos submetidos a uma cirurgia, na qual o nervo foi esmagado com um fórceps de ponta fina ($0,05 \times 0,01$ mm). Os animais submetidos a essa cirurgia foram sacrificados após sete e 14 dias. Os nervos desses animais foram comparados aos nervos de animais que não sofreram a lesão, servindo como controle. Esse procedimento foi realizado pela aluna Maria Alice de Paula, sob a orientação do Prof. Vinícios Ribas do *RibasTeam-ICB/UFMG*.

As medições nos nervos ópticos foram realizadas utilizando os parâmetros $\omega_1 = 816$ nm e $\omega_2 = 1064$ nm. Essas medições permitiram a excitação de frequências específicas, sendo uma delas 2856cm^{-1} . A frequência de 2856cm^{-1} está associada às vibrações de estiramento simétrico das ligações C-H em grupos metileno ($-CH_2$), presentes em moléculas orgânicas, como lipídios. Na análise da WD, a excitação dessa frequência pode fornecer informações valiosas sobre as mudanças bioquímicas que ocorrem nos nervos durante o processo de degeneração, ajudando a compreender os mecanismos bioquímicos subjacentes.

Foram medidos 50 nervos ópticos de camundongos no grupo controle, 48 nervos ópticos de camundongos sacrificados após sete dias, e 40 nervos ópticos de camundongos sacrificados após 14 dias.

Na Figura 15, apresentamos uma imagem detalhada do nervo óptico de camundongo um modelo controle utilizando a técnica de CARS. Para esse imageamento, foi empregado um comprimento de onda de 816nm, que, conforme mencionado anteriormente, excita a frequência vibracional específica de 2856cm^{-1} . Essa escolha permite uma visualização clara dos lipídios presentes no nervo óptico.

A Figura 16 ilustra um cenário semelhante ao da Figura 15, mas com uma amostra obtida de um animal que passou por um procedimento cirúrgico. Este animal foi sacrificado sete dias após a cirurgia, permitindo observar como a intervenção cirúrgica afeta a composição do nervo óptico ao longo do tempo. Comparando com a Figura 15, é possível identificar alterações, como um aumento nas áreas escuras, que podem estar associadas à redução de lipídios nessas regiões. Esta comparação oferece uma visão dinâmica das respostas do nervo óptico após a cirurgia.

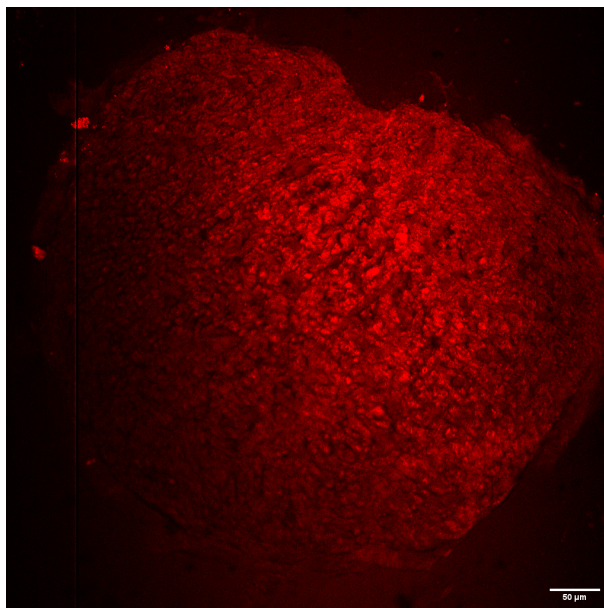


Figura 15 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo controle com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$.

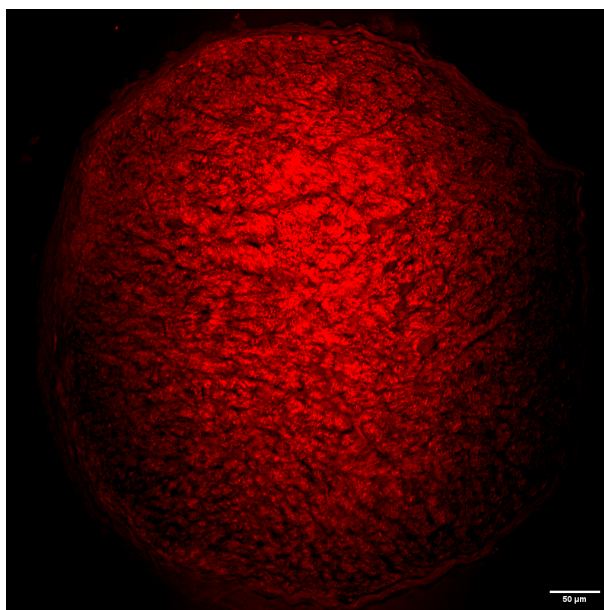


Figura 16 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo operado sete dias com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$.

Na Figura 17, repetimos o procedimento de imageamento utilizando a frequência vibracional de 2856cm^{-1} em uma amostra de um animal sacrificado 14 dias após a cirurgia que causou a lesão no nervo óptico. Este período prolongado nos permite estudar as mudanças adicionais que ocorrem no nervo óptico com o passar do tempo após a intervenção cirúrgica. A comparação com as Figuras 15 e 16, assim como com a Figura

14, revela uma maior extensão das áreas escuras associadas à falta de lipídios. Essas observações fornecem uma compreensão mais profunda das alterações estruturais induzidas pela lesão nervosa e pela subsequente degeneração do tecido, permitindo uma análise mais completa dos processos de degeneração do nervo óptico.

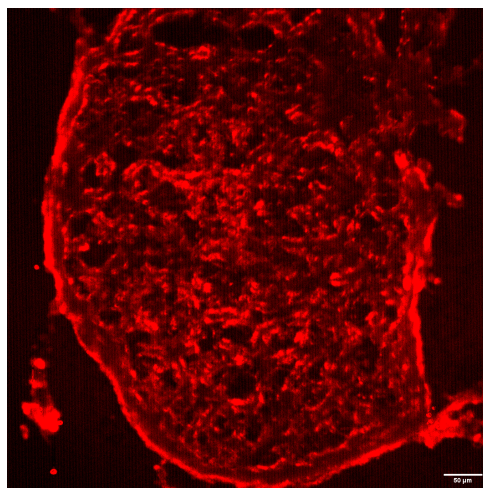


Figura 17 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo operado 14 dias com frequência vibracional excitada em 2845cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$.

A Figura 18 apresenta uma comparação entre a utilização do CARS e a fluorescência de dois fótons (TPEF) *two-photon excited autofluorescence* aplicadas a um corte transversal de nervo óptico. Esta imagem demonstra a eficiência do CARS em comparação com o TPEF na qualidade da imagem e na intensidade do sinal, evidenciando as vantagens da técnica CARS na obtenção de detalhes estruturais e bioquímicos do tecido nervoso.

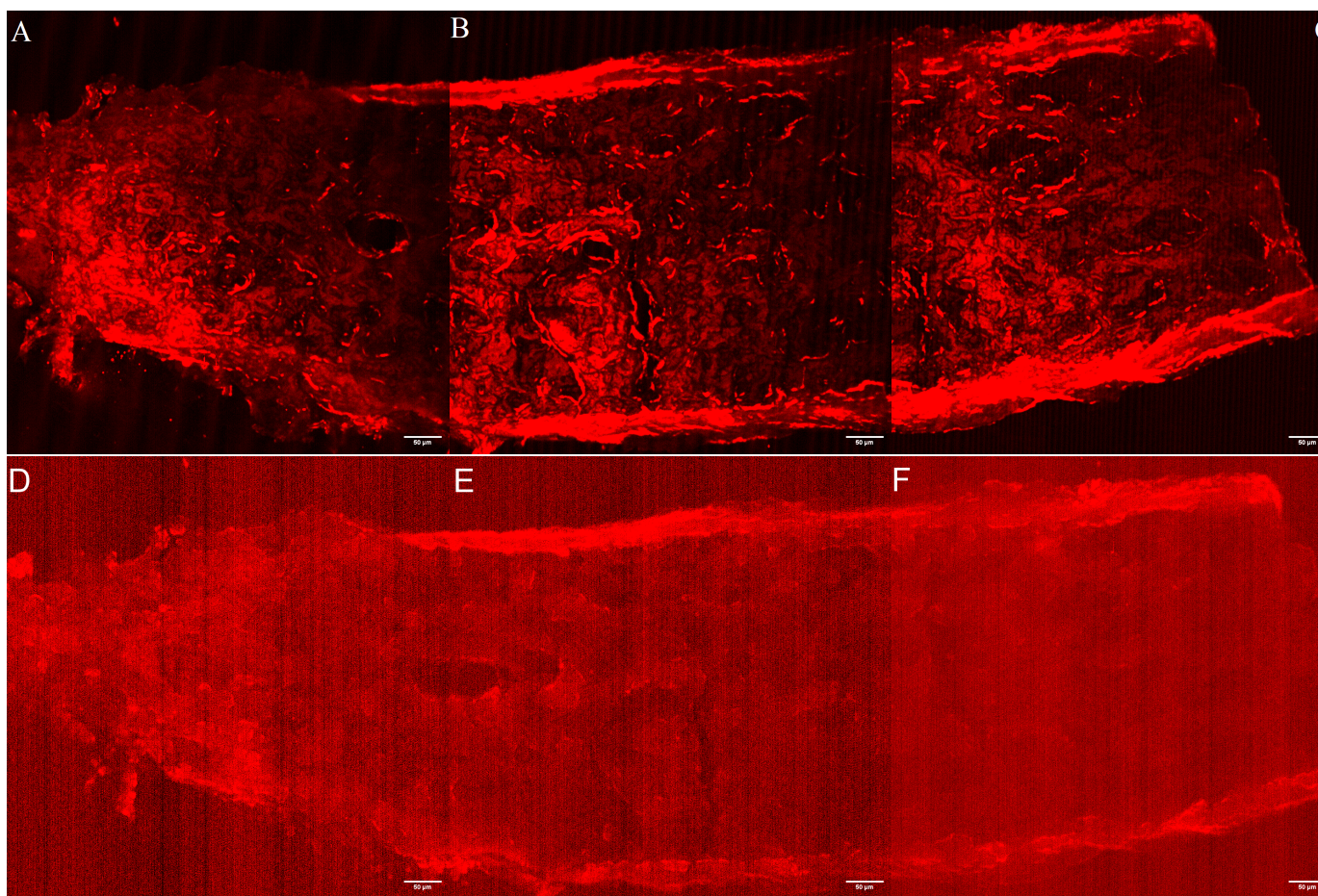


Figura 18 – Imagem do nervo óptico em corte transversal com frequência vibracional excitada em 2845cm^{-1} comparando CARS e TPEF, em A,B e C a montagem que forma a imagem CARS e em E,F e G a montagem que formam a imagem em TPEF. Com barra de escala de $50\mu\text{m}$.

Através da comparação das Figuras 15, 16 e 17, demonstrou-se que o CARS se destaca como uma excelente opção para a caracterização da WD, sendo capaz de revelar diferenças morfológicas entre três amostras do mesmo tipo, porém em condições estruturais distintas. Esta técnica permite uma análise detalhada das variações na estrutura da WD, oferecendo insights valiosos sobre suas características morfológicas sob diferentes contextos experimentais.

Adicionalmente, a Figura 18 compara a utilização do CARS e da TPEF aplicadas a um corte transversal de nervo óptico. A imagem CARS apresenta maior clareza e definição das estruturas do nervo óptico. As áreas analisadas são visíveis de forma mais nítida e menos sobrepostas, facilitando a identificação e observação das características específicas, como a distribuição de lipídios. Em contraste, a imagem TPEF parece mais difusa, o que pode dificultar a distinção precisa das estruturas e a interpretação dos resultados. Essa comparação ressalta a superioridade do CARS na qualidade da imagem e na intensidade do sinal, evidenciando sua eficiência em relação ao TPEF. A combinação dessas técnicas

reforça a capacidade do CARS de fornecer detalhes estruturais e bioquímicos precisos, consolidando-o como uma ferramenta poderosa para a análise da WD.

5.3 Doença de Huntington

Em colaboração com o Prof. Rafael Viera e as alunas Caroline Borges e Sofia Godoi, do grupo PLUS Ações e Reações do ICB/UFMG, foram realizadas experimentos relacionadas à doença de Huntington, nas quais também foram feitas medições em nervos ópticos de camundongos transgênicos, apresentando dois modelos diferentes: o modelo controle e o modelo da doença de Huntington, as amostras de nervos óptico foram cedidas pela Profa. Fabíola Mara Ribeiro com protocolo CEUA: 324/2022 como material de descarte.

As medições foram realizadas utilizando CARS, com os comprimentos de onda de $\omega_1 = 816\text{nm}$ e $\omega_2 = 1064\text{nm}$, excitando a frequência vibracional de 2856cm^{-1} . Assim como no estudo da WD, o objetivo era evidenciar as diferenças morfológicas, mas agora comparando o modelo controle com o modelo da HD.

Usando a configuração mencionada e com o intuito de diferenciar os dois modelos, foram realizadas 124 medições em cortes de nervo óptico do modelo controle e 129 medições no modelo da HD.

Na Figura 19 é apresentado um corte transversal do nervo óptico de um modelo controle, utilizando a excitação do modo vibracional de 2856cm^{-1} . Esta imagem mostra a distribuição típica de lipídios em um nervo óptico saudável, destacando a organização e a integridade estrutural esperadas nesse tipo de tecido.

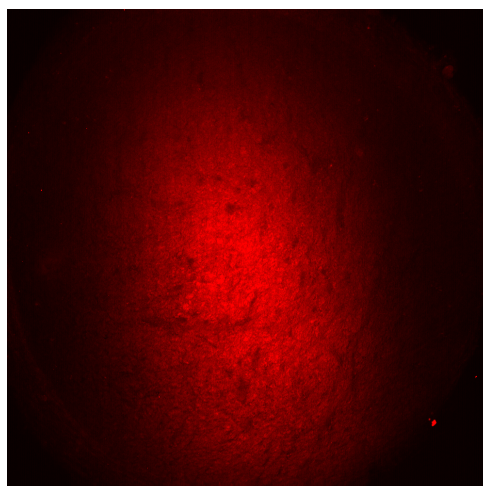


Figura 19 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo controle com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$.

Por outro lado, a Figura 20 ilustra o mesmo procedimento aplicado ao modelo da HD. A comparação entre as Figuras 19 e 20 revela mudanças morfológicas no nervo óptico associadas à HD. Observa-se um aumento nas áreas escuras na Figura 20, o que pode indicar a perda ou redução de lipídios, sugerindo uma degeneração estrutural e funcional no modelo da HD.

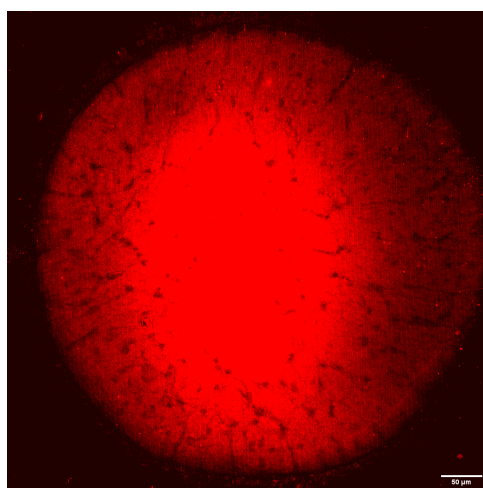


Figura 20 – Imagem CARS do corte de nervo óptico longitudinal modelo Huntigton com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $50\mu\text{m}$.

Para a comparação das imagens, utilizou-se o software *ImageJ* para calcular a intensidade das amostras dos modelos controle e HD. A análise foi realizada em diferentes regiões das imagens, variando o tamanho das áreas entre $59(\mu\text{m})$, $118(\mu\text{m})$, $177(\mu\text{m})$, $235(\mu\text{m})$, $295(\mu\text{m})$, como mostrado na tabela 1.

Type	59 μm	118 μm	177 μm	235 μm	295 μm	Média
HD	7.568.280	7.587.414	7.371.726	7.371.726	7.260.094	7.371.726
Control	7.332.998	7.258.690	7.139.617	6.994.210	6.857.842	7.139.17

Tabela 1 – Intensidade da imagem de CARS nos modelos HD e controle com frequência de 2856cm^{-1} .

A Tabela 1 apresenta a intensidade média do sinal para cada tamanho de área analisado, bem como a média geral entre esses valores. Observa-se que as amostras do modelo HD exibem uma intensidade superior em comparação ao modelo controle. Esse aumento pode estar associado a diversos fatores, como o acúmulo de lipídios decorrente de alterações metabólicas na doença de Huntington, resultando em uma maior concentração dessas moléculas nas regiões examinadas [89]. Além disso, a neuroinflamação característica da neurodegeneração pode estimular a produção lipídica, contribuindo para a intensificação do sinal [90]. Outro fator relevante é a possível diferença na densidade celular ou na compactação das estruturas ricas em lipídios, o que pode amplificar a resposta óptica detectada, evidenciando a distinção entre os modelos HD e controle.

Os resultados observados, tanto para o modelo HD quanto para o caso da WD, é necessário a aplicação de técnicas de *machine learning* para validar e aprofundar a análise das diferenças identificadas. A utilização dessas abordagens permitirá confirmar se o aumento da intensidade do sinal e as variações visuais observadas estão, de fato, correlacionados ao acúmulo de lipídios e à degeneração associada a esse processo.

5.4 O nervo trigêmeo

Em colaboração com a mestrandia Audrey Lopes Irie, do Laboratório de Dor e Analgesia, sob orientação do professor Thiago Roberto Lima Romero e da professora Camila Megale de Almeida Leite, realizamos estudos do nervo trigêmeo. Foram utilizadas configurações de laser idênticas às anteriores, com $\omega_1 = 816\text{ nm}$ e $\omega_2 = 1064\text{ nm}$, excitando na frequência de 2856 cm^{-1} . Com essa excitação, foram obtidas imagens CARS tanto do nervo trigêmeo operado quanto do nervo trigêmeo NaV, que representa o nervo em seu estado natural. Para essa análise, foram medidos cerca de 30 cortes de cada modelo de nervo.

A Figura 21 mostra um corte do nervo trigêmeo NaV obtido utilizando a técnica de CARS a 2856 cm^{-1} . A análise detalhada da imagem permite identificar as bainhas de mielina, que aparecem como estruturas circulares. As setas brancas na figura indicam algumas dessas bainhas de mielina, essenciais para a condução rápida dos impulsos nervosos ao longo dos axônios. Essas bainhas desempenham um papel vital na transmissão eficiente

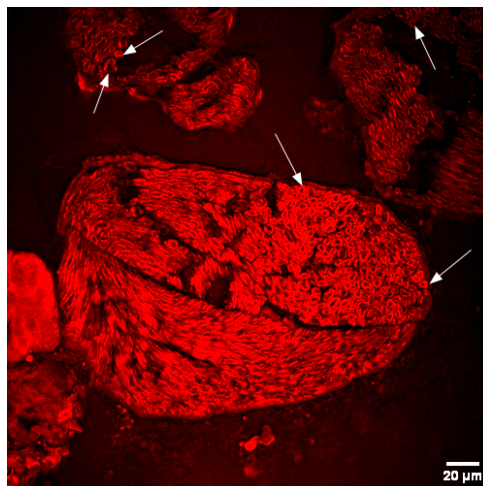


Figura 21 – Imagem CARS do corte de nervo trigêmeo modelo operado com frequência vibracional excitada em 2856cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$.

dos sinais sensoriais e motores entre o cérebro e o rosto.

Utilizando a mesma configuração, a Figura 22 apresenta um corte do nervo trigêmeo operado, obtido por meio de CARS a 2856 cm^{-1} . As bainhas de mielina são novamente evidenciadas, com algumas delas indicadas pelas setas brancas na imagem. Esse destaque das bainhas de mielina se deve à sua composição predominantemente lipídica, que é detectada com eficácia pela técnica CARS.

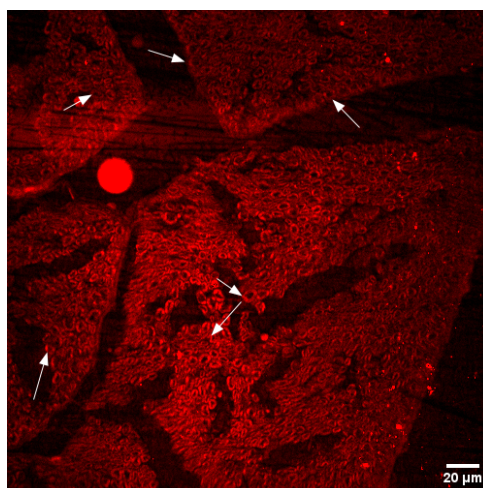


Figura 22 – Imagem CARS do corte de nervo trigêmeo modelo NaV com frequência vibracional excitada em 2845cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$.

O CARS demonstrou sua capacidade de imagem do nervo trigêmeo em ambos os modelos, apresentando imagens de alta definição que destacam as bainhas de mielina, partes extremamente importantes do nervo. No entanto, ainda não foi possível identificar diferenças significativas entre os dois modelos.

5.5 Leishmania

Para a análise das leishmanias, o sistema foi ajustado, alterando ω_1 de 816 nm para 811 nm, enquanto ω_2 foi mantido em 1064 nm. Essa configuração permitiu a excitação da frequência vibracional de 2932cm^{-1} , que está associada às ligações C-H presentes em lipídios e proteínas.

A Figura 23 apresenta uma imagem de SRS na frequência vibracional de 2932cm^{-1} de leishmanias da espécie *Leishmania infantum*. Além disso, a figura mostra um zoom digital em uma leishmania específica para que as características morfológicas da espécie fiquem claras.

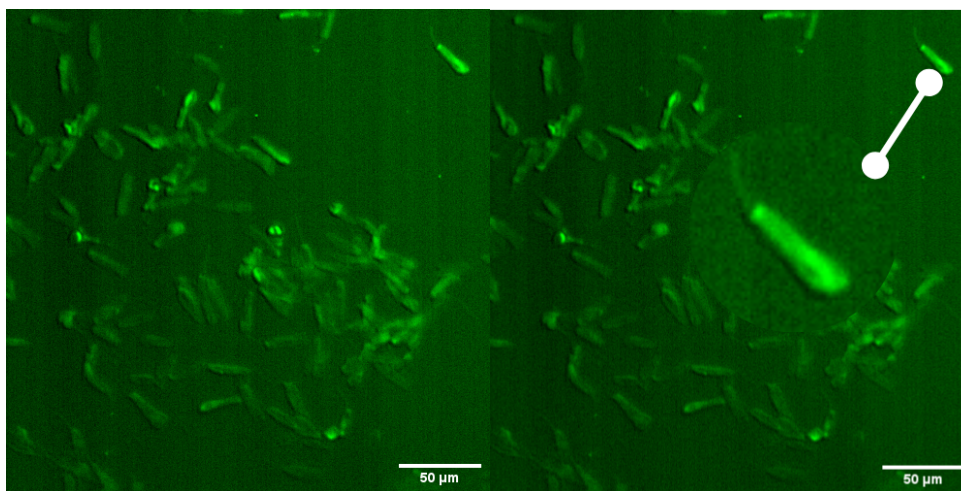


Figura 23 – Imagem SRS do leishmania infantum com frequência vibracional excitada em 2932cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$. Em A a imagem feita em SRS, em B o zoom em uma das leishmanias para destacar o formato.

Na Figura 24, o mesmo processo de SRS é repetido, excitando novamente a frequência vibracional de 2932cm^{-1} , mas agora em uma amostra da espécie *Leishmania amazonensis*.

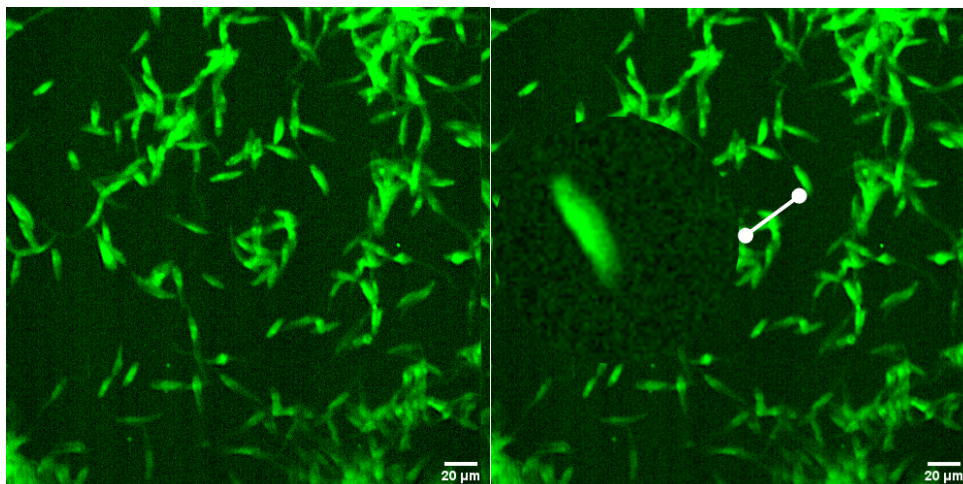


Figura 24 – Imagem SRS do C com frequência vibracional excitada em 2932cm^{-1} , com uma barra de escala de $20\mu\text{m}$. Em A a imagem feita em SRS, em B o zoom em uma das leishmanias para destacar o formato.

Foram obtidas aproximadamente 120 imagens de cada espécie. As figuras destacam as diferenças morfológicas entre as duas espécies de Leishmania. *Leishmania infantum* apresenta uma forma mais alongada em comparação com *Leishmania amazonensis*, que é mais curta e compacta, demonstrando a capacidade do SRS em diferenciar as espécies. Essas diferenças são cruciais para o entendimento das variações estruturais entre as espécies, proporcionando insights valiosos para estudos taxonômicos e para o desenvolvimento de estratégias específicas de diagnóstico e tratamento para cada espécie.

6 Conclusões e Perspectivas

6.1 Conclusões

Através deste trabalho, foi possível demonstrar a eficiência do CARS e do SRS em suas aplicações em materiais biológicos. Observou-se que o CARS é uma excelente ferramenta para a caracterização da WD, revelando diferenças morfológicas significativas entre amostras do mesmo tipo sob diferentes condições estruturais. Com uma análise detalhada das variações na estrutura da WD, o CARS oferece insights valiosos sobre suas características morfológicas em diversos contextos experimentais. Além disso, a comparação com a TPEF destaca a superioridade do CARS em termos de intensidade do sinal e capacidade de observar o que for desejado, graças à especificidade do sinal Raman.

A técnica CARS também se mostrou eficaz ao apresentar uma distinção entre as imagens dos modelos controle e da doença de Huntington, revelando alterações morfológicas significativas no nervo óptico associadas à doença. A capacidade do CARS de identificar e visualizar essas diferenças na distribuição e composição de lipídios proporciona perspectivas perspicazes sobre os mecanismos da degeneração neural na doença de Huntington. Esses achados não apenas aprimoram a compreensão científica da doença, mas também podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento, permitindo a detecção precoce e a monitorização precisa das mudanças estruturais no tecido nervoso.

O estudo utilizando CARS também demonstrou uma capacidade notável de visualizar o nervo trigêmeo em alta definição, evidenciando as bainhas de mielina com clareza. Estas bainhas são componentes cruciais do nervo, e a qualidade das imagens obtidas ressalta a eficácia desta técnica. Entretanto, é importante notar que, até o momento, não foram detectadas diferenças significativas entre os dois modelos analisados. Isso sugere que, apesar do potencial da técnica para fornecer imagens detalhadas, mais estudos e talvez abordagens complementares sejam necessários para identificar variações que possam existir entre os modelos.

Por fim, as figuras de SRS apresentadas ressaltam as diferenças morfológicas entre as duas espécies de leishmanias, sublinhando a eficácia do SRS em diferenciá-las. Essas distinções morfológicas são essenciais para compreender as variações estruturais entre as espécies, fornecendo informações valiosas para estudos taxonômicos. Além disso, essa compreensão é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento específicas para cada espécie, aprimorando assim a abordagem clínica e terapêutica contra as leishmanioses.

Em conclusão, ambas as técnicas se apresentam como ferramentas extremamente eficazes para a caracterização morfológica e são passíveis de desenvolvimento para aparelhos de diagnóstico.

6.2 Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras, este trabalho deixa a expectativa de uma análise computacional e de aprendizado de máquina para a distribuição de lipídios e proteínas nos modelos da doença de Huntington em relação ao grupo controle, buscando assim uma diferenciação mais precisa e com menor trabalho manual. Além disso, também se destaca a importância da caracterização e identificação da huntingtina, a proteína responsável pela doença de Huntington.

Há também a necessidade de um melhor desenvolvimento da técnica e da preparação das amostras para a diferenciação dos nervos trigêmeos. Essas melhorias somadas a análises computacionais e aprendizado de máquina tornariam possível uma caracterização e diferenciação mais precisa dos mesmos.

Por fim, a possibilidade de diferenciar as espécies de leishmanias por meio de modelos computacionais e aprendizado de máquina, a fim de entender se suas diferenças morfológicas se caracterizam apenas por serem espécies diferentes ou se esse fato também pode ser associado à diferença no tempo de vida dos protozoários.

REFERÊNCIAS

- [1] Raman, Chandrasekhara Venkata e Kariamanikkam Srinivasa Krishnan: *A new type of secondary radiation*. Nature, 121(3048):501–502, 1928. Citado 3 vezes nas páginas 15, 23 e 24.
- [2] De Faria, DLA, LGC Santos e NS Gonçalves: *Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman*. Quimica nova, 20:319–323, 1997. Citado na página 15.
- [3] Liu, Kai, Jiasong Li, Raksha Raghunathan, Hong Zhao, Xuping Li e Stephen TC Wong: *The progress of label-free optical imaging in alzheimer’s disease screening and diagnosis*. Frontiers in Aging Neuroscience, 13:699024, 2021. Citado na página 15.
- [4] Wei, Lu, Fanghao Hu, Zhixing Chen, Yihui Shen, Luyuan Zhang e Wei Min: *Live-cell bioorthogonal chemical imaging: stimulated Raman scattering microscopy of vibrational probes*. Accounts of chemical research, 49(8):1494–1502, 2016. Citado na página 15.
- [5] Zhang, Chi, DeLong Zhang e Ji Xin Cheng: *Coherent Raman scattering microscopy in biology and medicine*. Annual review of biomedical engineering, 17:415–445, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 25.
- [6] Vyawahare, Puja G, Gayatri M Ahire, Neelam M Yadav e Rupali R Tasgaonkar: *Neurodegenerative Disorder*. Citado na página 16.
- [7] Mayeux, Richard: *Epidemiology of neurodegeneration*. Annual review of neuroscience, 26(1):81–104, 2003. Citado na página 16.
- [8] Guimarães, JS, MA de M Freire, RR Lima, RD Souza-Rodrigues, AMR Costa, CD Dos Santos, CW Picanço-Diniz e W Gomes-Leal: *Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca*. Rev Neurol, 48(6):304–10, 2009. Citado na página 16.
- [9] Berth, Sarah H e Thomas E Lloyd: *Disruption of axonal transport in neurodegeneration*. Journal of Clinical Investigation, 133(11):e168554, 2023. Citado na página 16.
- [10] Luo, Liqun e Dennis DM O’Leary: *Axon retraction and degeneration in development and disease*. Annu. Rev. Neurosci., 28:127–156, 2005. Citado na página 16.
- [11] Park, Susanna B, Aysel Cetinkaya-Fisgin, Andreas A Argyriou, Ahmet Höke, Guido Cavaletti e Paola Alberti: *Axonal degeneration in chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: clinical and experimental evidence*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 94(11):962–972, 2023. Citado na página 16.

- [12] Cartelli, Daniele, Guido Cavaletti, Giuseppe Lauria e Cristina Meregalli: *Ubiquitin proteasome system and microtubules are master regulators of central and peripheral nervous system axon degeneration*. *Cells*, 11(8):1358, 2022. Citado na página 16.
- [13] Cao, Ying, Yi Wang e Jing Yang: *NAD⁺-dependent mechanism of pathological axon degeneration*. *Cell Insight*, 1(2):100019, 2022. Citado na página 16.
- [14] Cheng, Hao, He Lv, Yan Wang e Gui Qiang Wang: *Case report: Wallerian degeneration: The innate-immune response to adult-onset Still's disease peripheral nerve injury*. *Frontiers in Neurology*, 13:1016393, 2022. Citado na página 16.
- [15] Kerns, James M, James S Walter, Michael J Patetta, Anshum Sood, Awais K Hussain, Joyce J Chung, Abhishek Deshpande, Justin T DesLaurier, Raymond A Dieter, Maria Siemionow *et al.*: *Histological assessment of Wallerian degeneration of the rat tibial nerve following crush and transection injuries*. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 37(05):391–404, 2021. Citado na página 16.
- [16] Hustings, Nico e Marc Lemmerling: *MRI of Wallerian degeneration in the brainstem: a pictorial essay*. *Journal of the Belgian Society of Radiology*, 105(1), 2021. Citado na página 16.
- [17] Fischer, Tim, Christoph Stern, Patrick Freund, Martin Schubert e Reto Sutter: *Wallerian degeneration in cervical spinal cord tracts is commonly seen in routine T2-weighted MRI after traumatic spinal cord injury and is associated with impairment in a retrospective study*. *European Radiology*, 31:2923–2932, 2021. Citado na página 16.
- [18] Southwell, Amber L e Paul H Patterson: *Gene therapy in mouse models of huntington disease*. *The Neuroscientist*, 17(2):153–162, 2011. Citado na página 17.
- [19] Van Raamsdonk, Jeremy M, Hilal H Al-Shekaili, Laura Wagner, Tim W Bredy, Laura Chan, Jacqueline Pearson, Claudia Schwab, Zoe Murphy, Rebecca S Devon, Ge Lu *et al.*: *Huntingtin Decreases Susceptibility to a Spontaneous Seizure Disorder in FVN/B Mice*. *Aging and Disease*, 14(6):2249, 2023. Citado na página 17.
- [20] Huntington, George *et al.*: *On chorea*. 1872. Citado na página 17.
- [21] MacDonald, Marcy E, Christine M Ambrose, Mabel P Duyao, Richard H Myers, Carol Lin, Lakshmi Srinidhi, Glenn Barnes, Sherryl A Taylor, Marianne James, Nicolet Groot *et al.*: *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes*. *Cell*, 72(6):971–983, 1993. Nenhuma citação no texto.

- [22] Gusella, James F, Nancy S Wexler, P Michael Conneally, Susan L Naylor, Mary Anne Anderson, Rudolph E Tanzi, Paul C Watkins, Kathleen Ottina, Margaret R Wallace, Alan Y Sakaguchi *et al.*: *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*. *Nature*, 306(5940):234–238, 1983. Citado na página 17.
- [23] Migliore, Simone, Giulia D'Aurizio, Eugenia Scaricamazza, Sabrina Maffi, Consuelo Ceccarelli, Giovanni Ristori, Silvia Romano, Anna Castaldo, Mario Fichera, Giuseppe Curcio *et al.*: *Cognitive reserve in early manifest Huntington disease patients: leisure time is associated with lower cognitive and functional impairment*. *Journal of Personalized Medicine*, 12(1):36, 2022. Citado na página 17.
- [24] Mühlbäck, Alžbeta, Josef Mana, Michael Wallner, Wiebke Frank, Katrin S Lindenberg, Rainer Hoffmann, Olga Klempířová, Jiří Klempíř, G Bernhard Landwehrmeyer, Ondrej Bezdicek *et al.*: *Establishing normative data for the evaluation of cognitive performance in Huntington's disease considering the impact of gender, age, language, and education*. *Journal of Neurology*, 270(10):4903–4913, 2023. Citado na página 17.
- [25] Kim, Amy, Kathryn Lalonde, Aaron Truesdell, Priscilla Gomes Welter, Patricia S Brocardo, Tatiana R Rosenstock e Joana Gil-Mohapel: *New avenues for the treatment of Huntington's disease*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16):8363, 2021. Citado na página 17.
- [26] Crowell, Valerie, Richard Houghton, Akanksha Tomar, Tricia Fernandes e Ferdinando Squitieri: *Modeling manifest Huntington's disease prevalence using diagnosed incidence and survival time*. *Neuroepidemiology*, 55(5):361–368, 2021. Citado na página 17.
- [27] Maddury, Sucheer: *Automated Huntington's Disease Prognosis via Biomedical Signals and Shallow Machine Learning*. *ArXiv*, 2023. Citado na página 18.
- [28] Suri, N., A. Garg, S. Sharma, P. Gupta, G. Shree e R. Singh: *A literature review on trigeminal neuralgia*. *South Asian Journal of Health Professions*, 5(2):19–21, 2022. Citado na página 18.
- [29] Andrade Lourenção Freddi, Tomás de, Ana Carolina Ottaiano, Luciane Lucas Lucio, Diogo Goulart Corrêa e Luiz Celso Hygino da Cruz: *The Trigeminal Nerve: Anatomy and Pathology*. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 43(5):403–413, 2022, ISSN 0887-2171. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887217122000385>, Cranial Nerves Part 1. Citado na página 18.
- [30] Frizzo, Helitana Mara e RM VERONESE: *Neuralgia do trigêmeo: revisão bibliográfica analítica/Trigeminal neuralgia: na analythic review of the literature*. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*, 4(4):212–217, 2004. Citado na página 18.

- [31] CARPENTER, L: *MB—Neuroanatomia Humana, Ed*, 1978. Citado na página 18.
- [32] Bethamcharla, Raviteja, Hasini Reddy, Andrew F. Teich e Raymond F. Sekula Jr.: *Histopathology of the trigeminal ganglion and nerve: A historical review*. Journal of Neuroscience Research, 101(8):1203–1204, 2023. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.25192>. Citado na página 18.
- [33] Zeng, Chen, Chuan Zhang, Ye Han Li, Xu Feng, Man Jing Zhang, Ru Hui Xiao e Han Feng Yang: *Recent advances of magnetic resonance neuroimaging in trigeminal neuralgia*. Current Pain and Headache Reports, 25:1–7, 2021. Citado na página 18.
- [34] Leal, Paulo Roberto Lacerda: *Fraction of anisotropy and apparent diffusion coefficient as diagnostic tools in trigeminal neuralgia*. Acta Neurochirurgica, 161(7):1403–1405, 2019. Citado na página 18.
- [35] Sawahel, Heba Mohamed Atef, Ehab Shawky Mohamed, Atef Hammad Teima e Eman Awad Bedir Elakhder: *Magnetic Resonance Imaging in Trigeminal Neuralgia*. Journal of Advances in Medicine and Medical Research, páginas 146–156, 2022. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 32.
- [36] Silva-López, Raquel Elisa da: *Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos*. Química Nova, 33:1541–1548, 2010. Citado na página 19.
- [37] Berman, JD: *Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years*. Clinical infectious diseases, 24(4):684–703, 1997. Citado na página 19.
- [38] Aguiar, Paulo Fernando e Raíssa Katherine Rodrigues: *Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão*. Revista Unimontes Científica, 19(1):192–204, 2017. Citado na página 19.
- [39] Silveira, Fernando Tobias, Jeffrey Jon Shaw, Cléa Nazaré Carneiro Bichara e Jackson Maurício Lopes Costa: *Leishmaniose visceral americana*. Editora Cejup; UEPA; Instituto Evandro Chagas, 1997. Citado na página 19.
- [40] Osuji, Godson O, Wenceslaus C Madu e Paul M Johnson: *Electrophoretic Purification and Characterization of Human NADH-Glutamate Dehydrogenase Redox Cycle Isoenzymes Synthesizing Nongenetic Code-Based RNA Enzyme*. Advances in Enzyme Research, 9(2):19–35, 2021. Citado na página 19.
- [41] Harris, Daniel C e Michael D Bertolucci: *Symmetry and spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy*. Courier Corporation, 1989. Citado na página 21.

- [42] Fonseca, Emerson Alberto da *et al.*: *Identificação e caracterização de proteína β -amiloide em camundongos bitransgênicos para Alzheimer através de espectroscopia Raman: primeiro passo para o estabelecimento de uma plataforma de espectroscopia intraocular para fins de diagnóstico precoce*. 2020. Citado 3 vezes nas páginas 21, 29 e 42.
- [43] Boyd, Robert W: *Nonlinear optics*. Academic press, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 26.
- [44] Fonseca, Lucas Lafeté Prates da: *Propriedades ópticas não-lineares de terceira ordem em materiais bidimensionais*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2018. Citado na página 23.
- [45] Cunha, Renan Souza *et al.*: *Nonlinear optics in amyloid plaques and two-dimensional materials*. 2021. Citado 3 vezes nas páginas 24, 31 e 40.
- [46] Evans, Conor L e X Sunney Xie: *Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine*. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1:883–909, 2008. Citado 3 vezes nas páginas 24, 26 e 27.
- [47] Matousek, Pavel e Nicholas Stone: *Development of deep subsurface Raman spectroscopy for medical diagnosis and disease monitoring*. *Chemical Society Reviews*, 45(7):1794–1802, 2016. Citado na página 24.
- [48] Pezacki, John Paul, Jessie A Blake, Dana C Danielson, David C Kennedy, Rodney K Lyn e Ragunath Singaravelu: *Chemical contrast for imaging living systems: molecular vibrations drive CARS microscopy*. *Nature chemical biology*, 7(3):137–145, 2011. Citado na página 24.
- [49] Polli, Dario, Vikas Kumar, Carlo M Valensise, Marco Marangoni e Giulio Cerullo: *Broadband coherent Raman scattering microscopy*. *Laser & Photonics Reviews*, 12(9):1800020, 2018. Citado na página 25.
- [50] Rostron, Paul e Dina Gerber: *Raman Spectroscopy, a review*. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 6:50–64, setembro 2016. Citado 3 vezes nas páginas 25, 28 e 29.
- [51] Hellwarth, Robert W: *Theory of stimulated Raman scattering*. *Physical Review*, 130(5):1850, 1963. Citado na página 28.
- [52] Freudiger, Christian W, Wei Min, Brian G Saar, Sijia Lu, Gary R Holtom, Chengwei He, Jason C Tsai, Jing X Kang e X Sunney Xie: *Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy*. *Science*, 322(5909):1857–1861, 2008. Citado na página 28.

- [53] Levenson, Marc: *Introduction to Nonlinear Laser Spectroscopy 2e*. Elsevier, 2012. Citado na página 28.
- [54] Cheng, Ji Xin e Xiaoliang Sunney Xie: *Coherent Raman scattering microscopy*. CRC press, 2016. Citado na página 30.
- [55] Alfonso-García, Alba, Richa Mittal, Eun Seong Lee e Eric O Potma: *Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: a tutorial*. Journal of biomedical optics, 19(7):071407–071407, 2014. Citado na página 30.
- [56] Rigneault, Hervé e Pascal Berto: *Tutorial: Coherent Raman light matter interaction processes*. Apl Photonics, 3(9), 2018. Citado na página 30.
- [57] Cunha, Renan, Lucas Lafeta, Emerson A Fonseca, Alexandre Barbosa, Marco A Romano-Silva, Rafael Vieira, Ado Jorio e Leandro M Malard: *Nonlinear and vibrational microscopy for label-free characterization of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease model*. Analyst, 146(9):2945–2954, 2021. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 33.
- [58] Pfeffer, Christian P, Bjorn R Olsen, Feruz Ganikhanov e François Légaré: *Multimodal nonlinear optical imaging of collagen arrays*. Journal of structural biology, 164(1):140–145, 2008. Citado na página 32.
- [59] Chen, Hongtao, Haifeng Wang, Mikhail N Slipchenko, YooKyung Jung, Yunzhou Shi, Jiabin Zhu, Kimberly K Buhman e Ji Xin Cheng: *A multimodal platform for nonlinear optical microscopy and microspectroscopy*. Optics express, 17(3):1282–1290, 2009. Citado na página 32.
- [60] Mazumder, Nirmal, Naveen K Balla, Guan Yu Zhuo, Yury V Kistenev, Rajesh Kumar, Fu Jen Kao, Sophie Brasselet, Viktor V Nikolaev e Natalya A Krivova: *Label-free nonlinear multimodal optical microscopy—basics, development, and applications*. Frontiers in Physics, 7:170, 2019. Citado na página 32.
- [61] Meyer, Tobias, Norbert Bergner, Christiane Bielecki, Christoph Krafft, Denis Akimov, Bernd FM Romeike, Rupert Reichart, Rolf Kalff, Benjamin Dietzek e Jürgen Popp: *Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis*. Journal of biomedical optics, 16(2):021113–021113, 2011. Citado na página 32.
- [62] Heuke, S, N Vogler, T Meyer, D Akimov, F Kluschke, H J Röwert-Huber, J Lademann, B Dietzek e J Popp: *Multimodal mapping of human skin*. British Journal of Dermatology, 169(4):794–803, 2013. Citado na página 32.
- [63] Kwan, Alex C, Karen Duff, Gunnar K Gouras e Watt W Webb: *Optical visualization of Alzheimer's pathology via multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation*. Optics express, 17(5):3679–3689, 2009. Citado na página 32.

- [64] Wang, Shu, Bingbing Lin, Guimin Lin, Caihong Sun, Ruolan Lin, Jia Huang, Jing Tao, Xingfu Wang, Yunkun Wu, Lidian Chen *et al.*: *Label-free multiphoton imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse models*. *Neurophotonics*, 6(4):045008–045008, 2019. Citado na página 32.
- [65] Chakraborty, Sandeep, Sheng Tse Chen, Yang Ting Hsiao, Ming Jang Chiu e Chi Kuang Sun: *Additive-color multi-harmonic generation microscopy for simultaneous label-free differentiation of plaques, tangles, and neuronal axons*. *Biomedical Optics Express*, 11(2):571–585, 2020. Citado na página 32.
- [66] Kiskis, Juris, Helen Fink, Lena Nyberg, Jacob Thyr, Jia Yi Li e Annika Enejder: *Plaque-associated lipids in Alzheimer's diseased brain tissue visualized by nonlinear microscopy*. *Scientific reports*, 5(1):13489, 2015. Citado na página 32.
- [67] Lee, Jang Hyuk, Dae Hwan Kim, Woo Keun Song, Myoung Kyu Oh e Do Kyeong Ko: *Label-free imaging and quantitative chemical analysis of Alzheimer's disease brain samples with multimodal multiphoton nonlinear optical microspectroscopy*. *Journal of Biomedical Optics*, 20(5):056013–056013, 2015. Citado na página 32.
- [68] Ji, Minbiao, Michal Arbel, Lili Zhang, Christian W Freudiger, Steven S Hou, Dongdong Lin, Xinju Yang, Brian J Bacsikai e X Sunney Xie: *Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy*. *Science advances*, 4(11):eaat7715, 2018. Citado na página 32.
- [69] Cui, Sishan, Shuo Zhang e Shuhua Yue: *Raman spectroscopy and imaging for cancer diagnosis*. *Journal of healthcare engineering*, 2018(1):8619342, 2018. Citado na página 34.
- [70] Austin, Lauren A, Sam Osseiran e Conor L Evans: *Raman technologies in cancer diagnostics*. *Analyst*, 141(2):476–503, 2016. Citado na página 34.
- [71] Kong, Kenny, Catherine Kendall, Nicholas Stone e Ioan Notingher: *Raman spectroscopy for medical diagnostics—From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection*. *Advanced drug delivery reviews*, 89:121–134, 2015. Citado na página 34.
- [72] Sarri, Barbara, Rafaël Canonge, Xavier Audier, Emma Simon, Julien Wojak, Fabrice Caillol, Cécile Cador, Didier Marguet, Flora Poizat, Marc Giovannini *et al.*: *Fast stimulated Raman and second harmonic generation imaging for intraoperative gastrointestinal cancer detection*. *Scientific reports*, 9(1):10052, 2019. Citado na página 34.
- [73] Murugappan, Sivasubramanian, Syed AM Tofail e Nanasahab D Thorat: *Raman Spectroscopy: A Tool for Molecular Fingerprinting of Brain Cancer*. *ACS omega*, 8(31):27845–27861, 2023. Citado 3 vezes nas páginas 34, 35 e 36.

- [74] Desroches, Joannie, Michael Jermyn, Michael Pinto, Fabien Picot, Marie Andrée Tremblay, Sami Obaid, Eric Marple, Kirk Urmeý, Dominique Trudel, Gilles Soulez *et al.*: *A new method using Raman spectroscopy for in vivo targeted brain cancer tissue biopsy*. *Scientific reports*, 8(1):1792, 2018. Citado na página 36.
- [75] Kelly, Jemma G, Júlio Trevisan, Andrew D Scott, Paul L Carmichael, Hubert M Pollock, Pierre L Martin-Hirsch e Francis L Martin: *Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: a multistage approach linking computational analysis with biomarkers*. *Journal of proteome research*, 10(4):1437–1448, 2011. Citado na página 36.
- [76] Uckermann, Ortrud, Roberta Galli, Sandra Tamosaityte, Elke Leipnitz, Kathrin D Geiger, Gabriele Schackert, Edmund Koch, Gerald Steiner e Matthias Kirsch: *Label-free delineation of brain tumors by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma*. *PloS one*, 9(9):e107115, 2014. Citado na página 37.
- [77] Pohling, Christoph, Thomas Bocklitz, Alex S Duarte, Cinzia Emmanuello, Mariana S Ishikawa, Benjamin Dietzeck, Tiago Buckup, Ortrud Uckermann, Gabriele Schackert, Matthias Kirsch *et al.*: *Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy of brain tissue with higher ranking data classification for biomedical imaging*. *Journal of biomedical optics*, 22(6):066005–066005, 2017. Citado na página 37.
- [78] Meyer, Tobias, Norbert Bergner, Christiane Bielecki, Christoph Krafft, Denis Akimov, Bernd FM Romeike, Rupert Reichart, Rolf Kalff, Benjamin Dietzek e Jürgen Popp: *Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis*. *Journal of biomedical optics*, 16(2):021113–021113, 2011. Citado na página 37.
- [79] Galli, Roberta, Ortrud Uckermann, Achim Temme, Elke Leipnitz, Matthias Meinhardt, Edmund Koch, Gabriele Schackert, Gerald Steiner e Matthias Kirsch: *Assessing the efficacy of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy for the detection of infiltrating glioblastoma in fresh brain samples*. *Journal of Biophotonics*, 10(3):404–414, 2017. Citado na página 37.
- [80] Ji, Minbiao, Daniel A Orringer, Christian W Freudiger, Shakti Ramkissoon, Xiaohui Liu, Darryl Lau, Alexandra J Golby, Isaiah Norton, Marika Hayashi, Nathalie YR Agar *et al.*: *Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy*. *Science translational medicine*, 5(201):201ra119–201ra119, 2013. Citado na página 37.
- [81] Soltani, Soheil, Zhe Guang, Zhaobin Zhang, Jeffrey J Olson e Francisco E Robles: *Label-free detection of brain tumors in a 9L gliosarcoma rat model using stimulated*

- Raman scattering-spectroscopic optical coherence tomography*. Journal of Biomedical Optics, 26(7):076004–076004, 2021. Citado na página 37.
- [82] Lu, Fa Ke, Srinjan Basu, Vivien Igras, Mai P Hoang, Minbiao Ji, Dan Fu, Gary R Holtom, Victor A Neel, Christian W Freudiger, David E Fisher *et al.*: *Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(37):11624–11629, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 39.
- [83] Jannink, I, B Risberg, PJ van Diest e JPA Baak: *Heterogeneity of mitotic activity in breast cancer*. Histopathology, 29(5):421–428, 1996. Citado na página 38.
- [84] Tentler, John J, Aik Choon Tan, Colin D Weekes, Antonio Jimeno, Stephen Leong, Todd M Pitts, John J Arcaroli, Wells A Messersmith e S Gail Eckhardt: *Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development*. Nature reviews Clinical oncology, 9(6):338–350, 2012. Citado na página 39.
- [85] Warner, Christina L e Clay J Cockerell: *The new seventh edition American Joint Committee on Cancer staging of cutaneous non-melanoma skin cancer: a critical review*. American journal of clinical dermatology, 12(3):147–154, 2011. Citado na página 39.
- [86] Fonseca, Emerson A, Lucas Lafetá, Renan Cunha, Hudson Miranda, João Campos, Helton G Medeiros, Marco A Romano-Silva, Raigna A Silva, Alexandre S Barbosa, Rafael P Vieira *et al.*: *A fingerprint of amyloid plaques in a bitransgenic animal model of Alzheimer’s disease obtained by statistical unmixing analysis of hyperspectral Raman data*. Analyst, 144(23):7049–7056, 2019. Citado na página 39.
- [87] Fonseca, Emerson A, Lucas Lafeta, João Luiz Campos, Renan Cunha, Alexandre Barbosa, Marco A Romano-Silva, Rafael Vieira, Leandro M Malard e Ado Jorio: *Micro-Raman spectroscopy of lipid halo and dense-core amyloid plaques: aging process characterization in the Alzheimer’s disease APPswePS1 Δ E9 mouse model*. Analyst, 146(19):6014–6025, 2021. Citado na página 39.
- [88] Cunha, Renan, Lucas Lafeta, Emerson A Fonseca, Alexandre Barbosa, Marco A Romano-Silva, Rafael Vieira, Ado Jorio e Leandro M Malard: *Multimodal microscopy for characterization of amyloid- β plaques biomarkers in animal model of Alzheimer’s disease*. arXiv preprint arXiv:2102.03993, 2021. Citado na página 39.
- [89] Kreilaus, Fabian, Adena S Spiro, Catriona A McLean, Brett Garner e Andrew M Jenner: *Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington’s disease post mortem brain tissue*. Neuropathology and applied neurobiology, 42(6):535–546, 2016. Citado na página 53.

-
- [90] Phillips, Gabrielle R, Sarah E Hancock, Simon HJ Brown, Andrew M Jenner, Fabian Kreilau, Kelly A Newell e Todd W Mitchell: *Cholesteryl ester levels are elevated in the caudate and putamen of Huntington's disease patients*. Scientific Reports, 10(1):20314, 2020. Citado na página 53.

Apêndices

APENDICE A - Código Python para Automação do Estágio

```
import sys
import time
#both = port_facade.GetConversation(1)
axis1 = port_facade.GetConversation(1, 1)
axis2 = port_facade.GetConversation(1, 2)
### Definir posição atual
current_position = conversation.Request("get pos").Data
print("Current position is %d microsteps." % current_position)
### Definir instruções de movimentação
current_position = conversation.Request("get pos").Data
print("Current position is %d microsteps." % current_position)
### Definir instruções de movimentação
n = input ("quantas repetições você quer fazer")
move_count_axis2 = input("Quantos passos você quer fazer eixo x?")
distance_axis2 = input("Quantos microsteps em cada passo?")
timer_axis2 = input ("Em quanto tempo cada passo?")
total_distance_axis2 = move_count_axis2 * distance_axis2
move_count_axis1 = input("Quantos passos você quer fazer no eixo y?")
distance_axis1 = input("Quantos microsteps em cada passo?")
timer_axis1 = input ("Em quanto tempo cada passo?")
total_distance_axis1 = move_count_axis1 * distance_axis1
time.sleep(timer_axis2)
for _ in range (n):
    for _ in range(move_count_axis2):
        axis2.Request("move rel", distance_axis2)
        conversation.PollUntilIdle()
        new_position = conversation.Request("get pos").Data
        print("New position is %d microsteps." % new_position)
        time.sleep(timer_axis2)
    for _ in range(move_count_axis1):
        axis1.Request("move rel", distance_axis1)
        conversation.PollUntilIdle()
        new_position = conversation.Request("get pos").Data
        print("New position is %d microsteps." % new_position)
        time.sleep(timer_axis1)
```